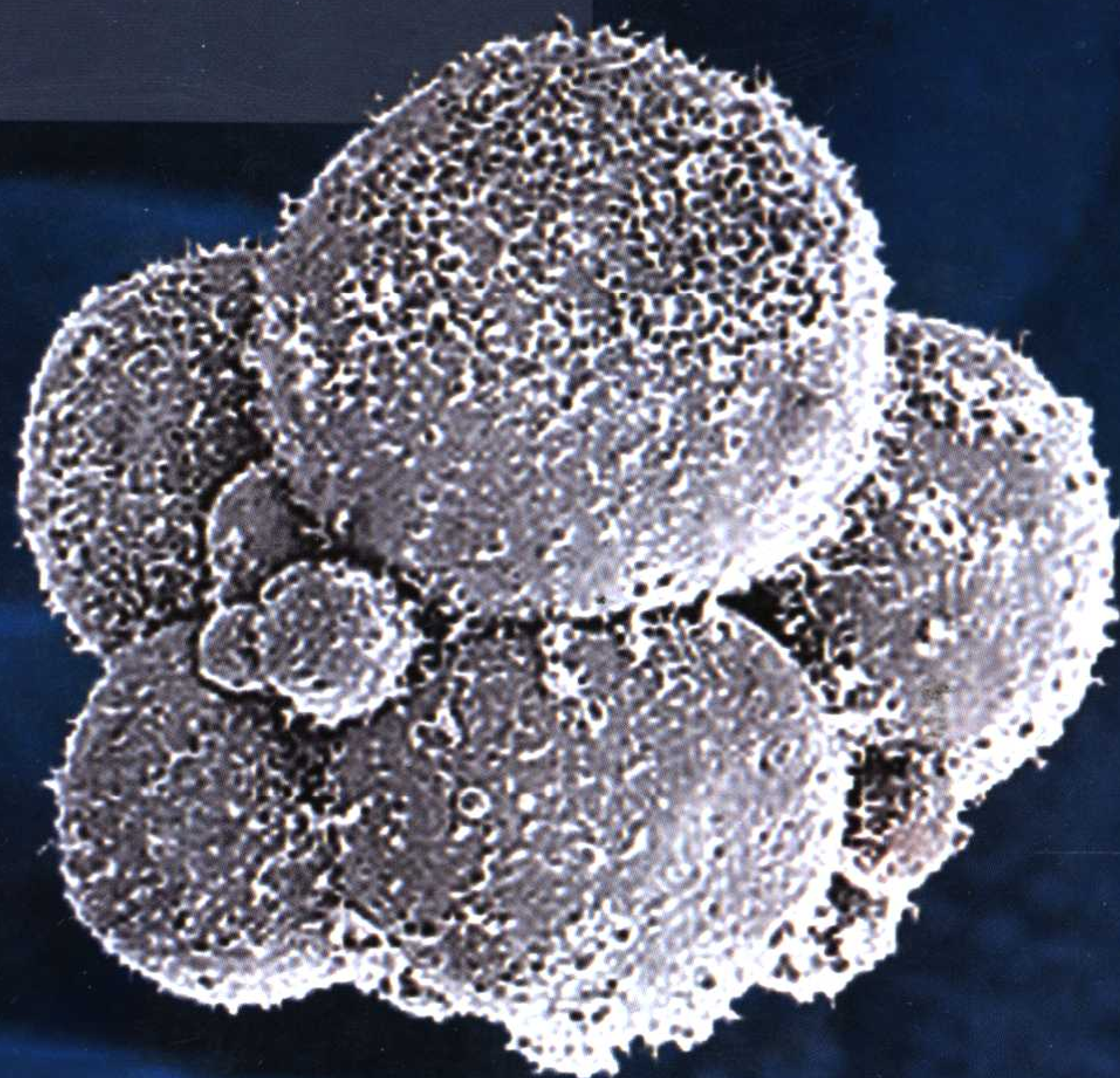
生命科学实验指南系列

干细胞实验指南

裴雪涛 主编

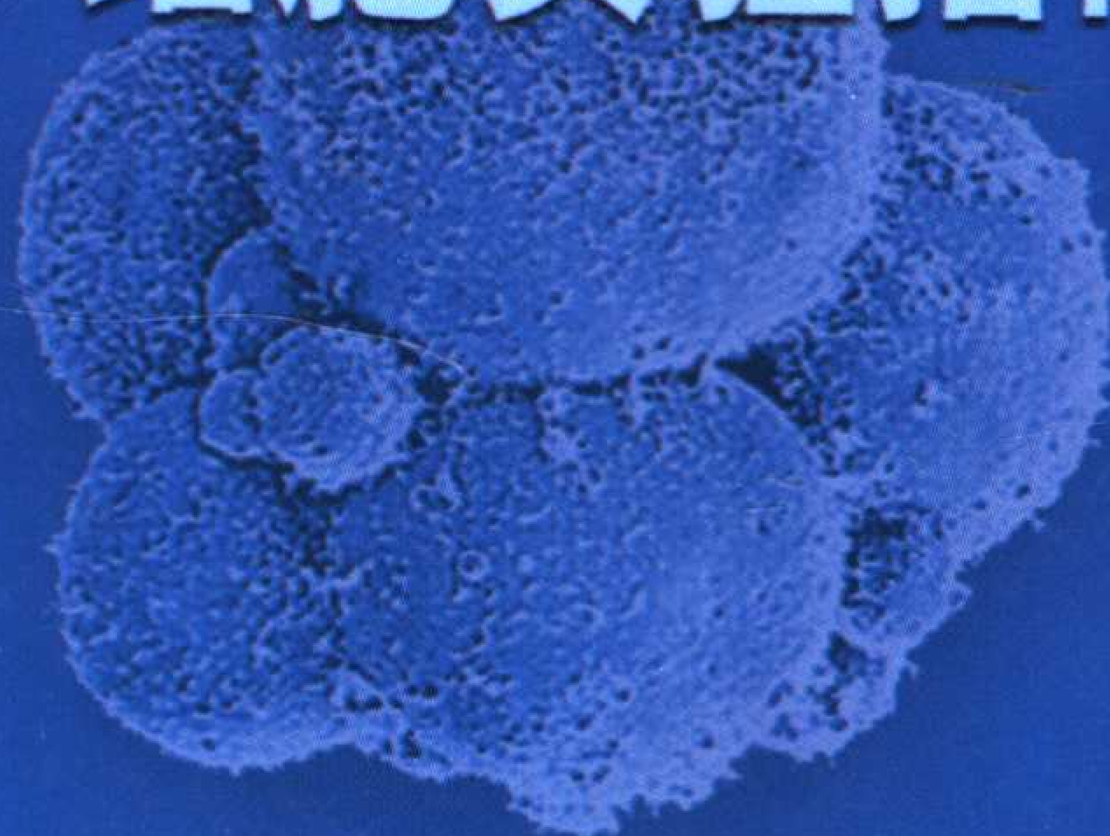




科学出版社
www.sciencep.com

(Q-1631.0101)

干细胞实验指南





ISBN 7-03-016193-9
9 787030 161932 >

销售分类建议：生物医学/生物科学/细胞生物学

生命科学编辑部
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail：spbio@163.net

ISBN 7-03-016193-9
定价：68.00 元

生命科学实验指南系列

干细胞实验指南

裴雪涛 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书以新颖、实用为基准，以可操作为目的，把干细胞领域的最新方法及技术加以凝练，按照实验操作指南的格式，对干细胞的分离纯化、鉴定、培养、扩增、诱导分化、核移植、细胞周期与调控、保存、复苏等技术进行系统描述。每一项技术均按基本原理、主要设备与试剂、操作步骤、结果判断、注意事项、参考文献等展开，希望达到系统、科学、全面地介绍干细胞研究的主要技术和实验方法的目的。

本书可用作干细胞研究、开发和应用的工具书，也可供细胞生物学、生物化学、分子生物学、基因组学、医学等相关领域的教学科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

干细胞实验指南/裴雪涛主编. —北京：科学出版社，2006
(生命科学实验指南系列)
ISBN 7-03-016193-9

I. 干… II. 裴… III. 干细胞-实验-指南 IV. Q24-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 097047 号

责任编辑：莫结胜 彭克里 席 慧/责任校对：朱光光
责任印制：钱玉芬/封面设计：耕者设计工作室

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717
http://www.sciencep.com
双青印刷厂 印刷
科学出版社编务公司排版制作
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2006年1月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2006年1月第一次印刷 印张：26 3/4 插页：1
印数：1—3 000 字数：615 000

定价：68.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换<双青>)

主　编： 裴雪涛

编　者：(按姓氏汉语拼音排序)

高艳红　管利东　郭　永　韩　姝
韩　颖　李绍青　李艳华　梁　峰
刘大庆　南　雪　裴雪涛　彭红梅
齐　冬　秦立蓬　师　伟　苏　平
王冬梅　王　卉　王　俊　王韫芳
谢小燕　闫　舫　杨丽平　杨　晓
杨　怡　杨印祥　姚海雷　袁红丰
岳慧敏　张　鹏　张　锐　赵敬湘
赵云山

参加编写单位：

军事医学科学院
中国人民解放军总医院
北京龙脉得生物技术有限公司
德国美天旎生物技术有限公司
美国BD生物技术有限公司
日本奥林巴斯生物技术有限公司

序

干细胞是具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞群体，即这些细胞可以通过细胞分裂来维持自身细胞群的大小,同时又可以进一步分化成为各种不同的组织细胞，从而构成机体中各种复杂的组织器官。随着干细胞技术的发展并根据干细胞本身所具有的特性，人类有可能在体外培养某些干细胞，定向诱导分化为我们所需要的各种组织细胞以供临床所需。以此为目的的干细胞工程学几乎涉及人体所有的重要组织和器官,也涉及人类面临的多数医学难题，如心血管疾病、自身免疫性疾病、糖尿病、骨质疏松、癌症、老年性痴呆、帕金森病、严重烧伤、脊髓损伤和遗传性缺陷等疾病的治疗。此外，干细胞研究还涉及克隆技术、组织工程学、功能基因组学和蛋白质组学、发育生物学、新药开发与药效、毒性评估等众多生命科学领域，并将在人类健康与疾病治疗方面产生极其重要而深远的影响。因此，干细胞的研究与应用在 *Science* 公布的 1999 年世界十大科技进展中名列榜首，并于 2000 年、2003 年、2004 年几度入选世界十大科技进展，已成为生命科学和生物医药领域最受关注的热点之一，并已成为衡量一个国家生命科学发展水平的重要指标，国际间的竞争也日趋激烈。

裴雪涛教授一直从事干细胞及其相关生命科学的基础与应用研究，年轻的编著者都是干细胞研究领域的实践者，他们掌握着这一领域最新的发展动态，有着扎实的理论功底和技术积累，有着严谨求实的工作作风和努力创新的开拓精神，并以自己的勤奋和努力不断探索和推动着这一学科的发展。在编写出版了《干细胞生物学》这一偏重理论知识的专著后，又一次把干细胞及其相关领域的技术原理、操作程序、结果判定等偏重于实际操作的实验方法归纳总结，使其更加标准化和规范化，更便于实验室间的交流与相互验证。该书是一部可操作性极强的工具书，再一次为我国的干细胞与再生医学事业做出了突出的贡献，并将进一步推动干细胞技术、克隆技术、组织工程技术以及其他相关生物技术和学科的发展。

中国科学院院士

吴祖泽

2005 年 6 月于北京

前　言

干细胞是具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞群体，干细胞的研究与应用几乎涉及了所有的生命科学和生物医药学领域，除了在细胞替代治疗、组织器官再生修复与重建、基因治疗中的重要意义外，它还将在基因组与蛋白质组研究、系统生物学研究、发育生物学模型、新药开发与药效、毒性评估等领域产生极其重要的影响。同时，由于干细胞研究与应用中所涉及的干细胞来源、人与动物细胞核物质的互换、哺乳动物的无性繁殖、克隆人等而引发的社会问题、伦理学问题、生物安全问题等也备受社会各界人士的关注。

近年来，随着发育生物学、实验血液学、神经生物学、细胞生物学、分子生物学、免疫学等学科的发展，以及计算机技术、纳米技术、新材料技术等高新技术的突飞猛进，干细胞的分离纯化、建系、性能研究、培养扩增、诱导分化、组织重构等有了突破性进展，部分干细胞技术已开始进入临床应用。这一系列的成就使干细胞及再生医学的研究与应用成为21世纪最受关注的科学领域之一，也多次入选 *Science* 世界十大科技进展，且这一热点还在不断地持续升温。然而，我们都知道，科学与技术是相互依存、相互促进的。一个新学科、新领域、新医疗措施的出现和完善，其依托的技术方法至关重要，如果没有成熟的技术、没有规范的操作、没有标准的判定依据、没有重复性好的实验方法，就难以获得可靠的实验数据和结果，也就无法得出令人信服的结论，当然也就不可能准确地进行同行间的交流。核移植及克隆技术的突破引发了干细胞研究乃至生命科学和医学的革命，这就是技术推动科学进步的最好证明。

为此，本书以新颖、实用、可重复为基准，以可操作、规范化为目的，与先前出版的《干细胞生物学》形成互补，理论联系实际，尽最大可能地收集整理目前国际通行的、认可的技术方法，每一种主要的技术方法均以基本原理、主要仪器设备和试剂、操作方法与程序、结果判定、实验技巧及注意事项等为主要内容，以求成为一本从事本行业实际操作人员的工具书，同时也可供关注此领域的政治家、科学家、社会学家和伦理学家参考。

我们深知，干细胞与克隆技术正处在高速发展的阶段，新的理论和技术方法层出不穷，虽然此书出版的时候也许又有新的技术涌现。但我们深信，基础的是可以互通的，经典的是可以长久的。在此，我要向参与编写此书的年轻科学家、技术专家、博士后和博士生们表示由衷的感谢。是这些工作在第一线的同道们用高度负责的态度、创新的理念、求实的精神以及对新知识的敏锐和对新技术的掌握，把最新的信息、方法和技术加以凝练，为从事干细胞、克隆技术、组织工程及其相关领域研究、开发和应用的同行提供了一本可随身相伴的工具书。

最后，我要特别感谢我的导师吴祖泽院士又一次给了我信心和勇气，并亲自为本书作序。而为本书的组织、联络、编辑、校对等做出贡献的南雪、白慈贤、施双双和陈琳等同事也功不可没，我为他们无私奉献的精神、务实高效的工作感到骄傲。此外，本书

的出版还得到国家863计划“组织器官工程”重大专项、国家973计划、国家杰出青年科学基金等项目的大力支持，在此深表谢意。也向提供部分技术资料并参与部分章节编写的北京龙脉得生物技术有限公司、德国美天旎生物技术有限公司、美国BD生物技术有限公司、日本奥林巴斯生物技术有限公司等企业表示感谢。

裴雪涛

2005年6月于北京

目　录

第1章　干细胞的分离纯化

1.1　密度梯度离心法

不同的细胞群的细胞密度不同(表 1.1)，比如血细胞成分中单个核细胞及血小板的密度为 1.075~1.090g/ml，红细胞和粒细胞(包括中性粒细胞及嗜酸及嗜碱性粒细胞)的密度为 1.092g/ml 左右，因此，利用一种密度为 1.075~1.092g/ml 的等渗溶液进行密度梯度离心，使不同密度的细胞按不同的密度梯度分布，就可以将不同密度的细胞群分开，从而使单个核细胞或者其他细胞从血细胞中分离出来。应用此种方法淋巴细胞的回收率约为 80%~90%，淋巴细胞的纯度约为 90%。不同动物所用的细胞分离液密度有所不同，例如，人淋巴细胞分离液密度为 1.077g/ml，大鼠淋巴细胞分离液密度为 1.083g/ml，小鼠淋巴细胞分离液密度为 1.092g/ml。

表 1.1　人类各种血细胞的密度

细胞	密度/(g/ml)	细胞	密度/(g/ml)
红细胞	1.090~1.110	淋巴细胞	1.052~1.077
嗜酸性粒细胞	1.090~1.095	B 淋巴细胞	1.062~1.075
中性粒细胞	1.080~1.085	T 淋巴细胞	1.065~1.077
嗜碱性粒细胞	1.070~1.080	NK 细胞	1.050~1.070
单核细胞	1.050~1.066	血小板	1.030~1.060

最常用的聚蔗糖-泛影酸钠(ficoll-hypaque, F/H)密度梯度离心法(以下简称 F/H 法)分离外周血及骨髓中的单个核细胞就是利用各种细胞密度的差异将它们分散于自上而下的液体层次中，单个核细胞及血小板的密度小于密度为 1.077g/ml 的 F/H 分离液，离心后处于 F/H 液的顶端。红细胞及粒细胞的密度比 F/H 密度高，离心后沉于 F/H 底端。血小板密度最小，可用低速离心与单个核细胞分开，或用胎牛血清梯度离心，将血小板托起，而单个核细胞沉于底部。

人骨髓或脐带血中单个核细胞(MNC)包括干细胞、淋巴细胞和单核细胞，一般认为，干细胞在形态上为淋巴样细胞，其密度与淋巴及单个核细胞的密度基本相同，因此通过密度梯度离心的方法，就可以收集到我们需要的细胞，而将不需要的细胞去除。利用密度为 1.077g/ml 左右的分层液做密度梯度离心，使一定密度的细胞按相应密度梯度分布，从而将各种血细胞加以分离。下面以外周血单个核细胞分离为例介绍此种分离方法。

1.1.1　试剂及配制

(1) 淋巴细胞分层液：有成品供应，密度为(1.077±0.001)g/ml。

(2) 台盼蓝染液：见附录 2。

1.1.2　操作方法

(1) 取血放入抗凝管，摇匀，用 pH7.2~7.6 的 Hank 缓冲液(或磷酸盐缓冲液)稀释血液 1~2 倍。

(2) 取淋巴细胞分层液 3~4ml，放入 15mm×150mm 的试管中。

(3) 用毛细吸管吸取稀释血液，在离分层液面上 1cm 处，沿试管壁徐徐加入，使稀释血液量叠于分层液上，稀释血液与分层液体积比例约为 2：1。

(4) 用水平离心机以 2000r/min 离心 30min，离心后其中的内容物分为三层，上层为血浆(内含血小板)，中间层为分层液，底层为红细胞和多核白细胞。在上、中层液体界面处可见到乳白色混浊的单个核细胞层。

(5) 用毛细吸管轻轻插入到白膜层，沿试管壁周缘吸取界面层的单个核细胞(图 1.1)，移入另一试管中。

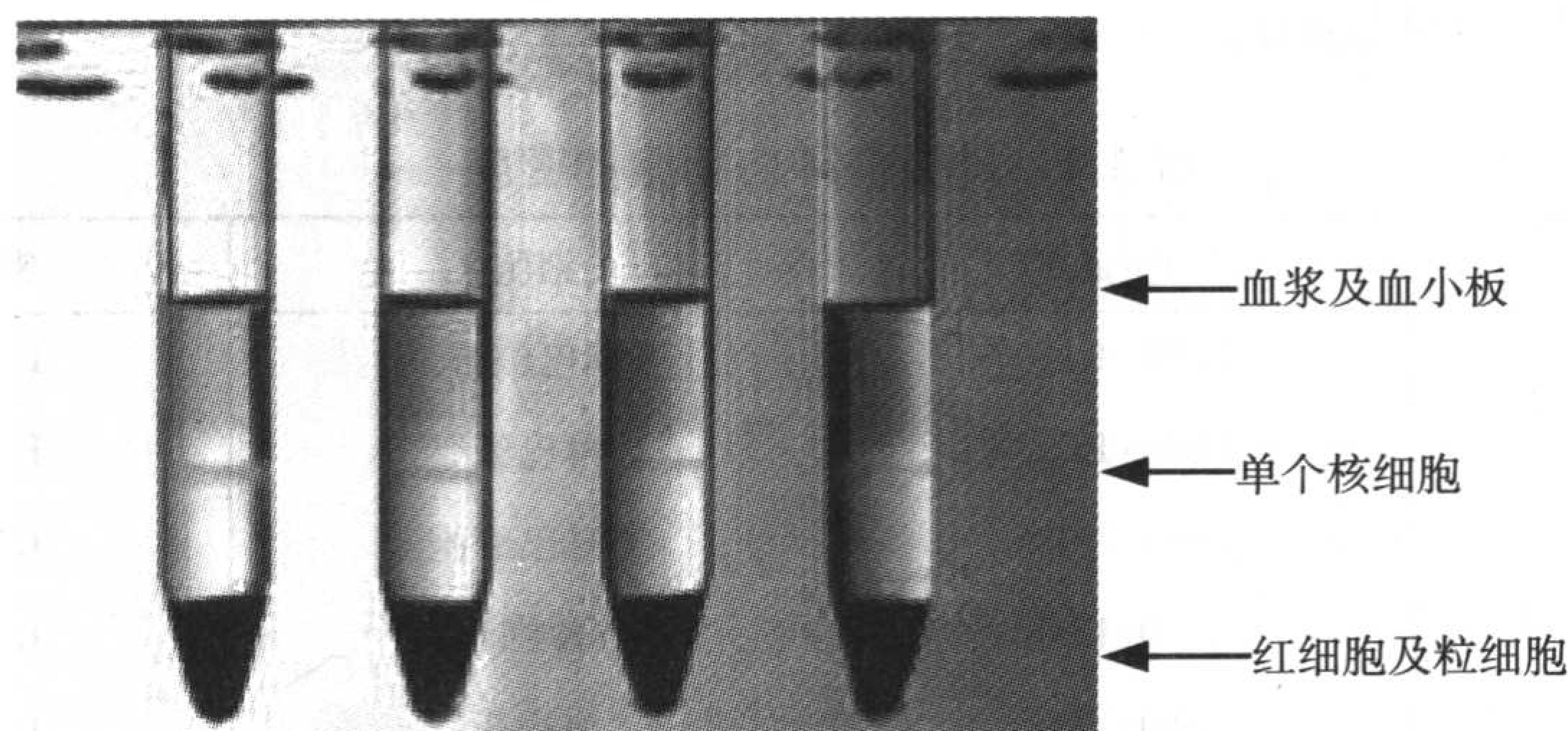


图 1.1　F/H 法分离淋巴细胞示意图

(6) 加 5 倍以上体积的不含 Ca^{2+} 、Mg^{2+}的 Hank 缓冲液，混匀，1500r/min 离心 10min，吸弃上清，重复洗涤 2 次。

(7) 末次离心后，吸尽上清，用含 10%血清的培养基重新混悬细胞，取 1 滴细胞悬液计数。

(8) 细胞活力检测：取 1×10^6~2×10^6 个细胞悬液加 1 滴 2%台盼蓝染液混匀，加盖片，显微镜高倍镜检，活细胞不着色，折光强；死细胞被染成蓝色，体积略膨大。活细胞数应在 95%以上。

1.1.3　注意事项

(1) 用稀释的全血可使单个核细胞获得率升高，将稀释的血液叠加于分层液上时，一定要细心，动作要轻，避免冲散分层液面或与分层液的混合而影响分离结果。

(2) 配制单个核细胞悬液所用的培养液要求等渗、具缓冲作用并对细胞无毒性。

(3) 吸取单个核细胞时，应避免吸出过多上清液或分层液而导致血小板污染。

(4) 配制好的单个核细胞可放室温或0~4℃，后一条件较好，可减少细胞代谢活动。注意不要迅速改变其所处的温度，以免造成“温度”休克。

1.1.4 备注

大容量血液可先用甲基纤维素或羟乙基淀粉沉降后，再采用上述方法分离。

将稀释后的血液按 4∶1 的比例与 0.5%的甲基纤维素溶液混匀，室温沉降后，吸取上层细胞，离心后，可获得有核细胞，再以 PBS 稀释，重复上述步骤。

1.2 单抗贴壁铺展法

单抗贴壁铺展法又称洗淘法(panning)。此方法的基本原理是抗原-抗体的特异性结合反应，因此称为单抗贴壁铺展法。将聚苯乙烯培养瓶或培养板用抗体包被，然后将细胞与其共孵育，这样，那些表达所包被的抗体所对应的抗原的细胞就选择性地结合到培养瓶或培养板的表面而与其他未结合的细胞群分开。收集未黏附细胞群，即阴性选择；漂洗培养瓶或培养板后，收集黏附细胞群，即阳性选择。如利用 CD34 单克隆抗体(McAb)孵育骨髓单个核细胞悬液，然后将孵育过的细胞悬液加至已包被好羊抗鼠抗体的培养瓶或培养板中。这样通过抗鼠抗体-$CD34^-$ McAb 的桥联结合反应使 $CD34^+$细胞结合固定在细胞培养板底，而非固定的淋巴细胞($CD34^-$)可通过轻吸培养板孔或培养瓶内细胞悬液而获得。此种方法还适用于 T 细胞与 B 细胞、T 细胞亚群 $CD4^+$或 $CD8^+$细胞及 $CD4^-CD8^-$双阴性 T 细胞等细胞的分离。在此，以骨髓 $CD34^+$细胞的分离纯化为例介绍此法。

1.2.1 实验材料、试剂及配制

(1) 淋巴细胞分层液：有成品供应，密度为(1.077±0.001)g/ml。

(2) 2%台盼蓝染液，见附录 2。

(3) 6 孔平底细胞培养板、毛细吸管等。

(4) 抗人 CD34 单克隆抗体，羊抗鼠抗体。

1.2.2 操作方法

(1) 密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞(方法见密度梯度离心法)。

(2) 制备洗淘板在 6 孔平底细胞培养板的每个孔中加 2.5ml 羊抗鼠(IgG 和 IgM)抗体[每孔加 10~20μg 抗体，以 F(ab')2 羊抗鼠 IgG 和 IgM 为准]。然后置室温 4~6h 或 4℃过夜。将上清液吸出，吸加含 1% FCS 的 PBS 液 2.5ml 于每孔，轻轻振摇，吸出所加液体，同上再吸取 2 次。然后将 2.5ml PBS(含 1% FCS)加入孔内，室温封闭 30min。用前用 PBS 洗涤 2 次，末次洗涤后，吸尽孔中液体。

(3) 将 2×10^7 个/ml 的骨髓单个核细胞悬液置于 15ml 离心管中，4℃、400*g* 离心 10min，弃上清，用含适合浓度的 CD34 抗体悬起细胞，冰浴中孵育 30min。

(4) 按每孔 1ml 细胞悬液的量加至已包被羊抗鼠抗体的 6 孔洗淘板中，然后置 4℃孵育 30~45min，轻吸孔内细胞悬液，此悬液即为 $CD34^-$细胞。

(5) 弃去每孔中的液体，PBS 洗涤一遍后，机械剥离黏附在培养皿表面的细胞，即用预冷的 PBS/0.2% BSA 用力冲洗平皿底部，收集冲下的细胞即为 $CD34^+$细胞。

1.2.3 注意事项

(1) 上述方法适用于这样的场合：待选择分离的细胞不会自发地黏附于塑料上。

(2) 也可用 $25cm^2$ 或 $28cm^2$ 的细胞培养瓶进行抗体包被，每瓶内加 2ml F(ab')2 羊抗鼠抗体(1mg/ml)，在 4℃冰箱内可长期存放。用前可将抗体液移出至另一培养瓶内继续包被。这种抗体液可重复使用 10~15 次。用 PBS 洗涤后的已包被好的培养瓶需在 2~3h 内立即使用。

(3) 有的实验室采用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液作为抗体的包被液，其目的在于其能使抗体牢固地与包被板表面结合。

(4) panning 法可用于分离混杂悬液中的大、小细胞群。用多克隆抗体包被效果好，但用 McAb 包被分离效果不满意。所以，采用间接 panning 法为好。

(5) 间接 panning 法不仅可用于分离多种细胞(直接法只能分离抗体相应的细胞)，而且致敏细胞所用 McAb 无需纯化。间接法可用于同时黏附多种 McAb 混合致敏细胞，以去除多种细胞。

(6) 间接 panning 法需用大量的高亲和层析纯抗体或高效价、特异性好的抗血清进行纯化。纯化的效果还取决于细胞黏附塑料平皿的强度和抗体结合塑料的能力。

(南　雪　裴雪涛)

1.3 免疫磁珠分选技术

随着对细胞功能的深入研究和细胞治疗的广泛开展，分选技术已日益引起人们的关注。细胞分选方法有很多种，主要可以归为两大类：FACS 分选和免疫磁珠分选。现以应用最为广泛的磁性细胞分选(magnetic activated cell sorting，MACS)技术为例，介绍免疫磁珠分选技术。MACS 技术因为操作简便、分选纯度高、回收率高、分选后细胞活性好等优点，已经成为细胞分选的标准方法。此技术应用领域极为广泛，从实验室到临床，从少量细胞分选到大量细胞分选，从常见细胞到稀有细胞甚至到复杂的细胞亚群分选，从人类细胞、小鼠细胞到其他种系的细胞分选，MACS 技术都得到了广泛的应用。在干细胞分选中，MACS 技术的作用更是不容忽视。

1.3.1 MACS 技术原理

MACS 技术是一种集免疫学、细胞生物学、磁力学等知识为一体的高度特异性细胞分选技术，其主要组成部分有 MACS 微珠、MACS 分选柱和 MACS 分选器。MACS 技

术的高度特异性来自抗体对抗原的特异性识别。其基本原理是将磁性微珠直接或者间接耦联在抗体上，通过抗原抗体反应使磁珠耦联的抗体与表达相应抗原的细胞特异性结合，磁性标记的细胞在经过一个带有梯度的高强度磁场时会滞留在磁场中，而不表达相应抗原的细胞因为没有磁性标记，首先流出来，从而达到磁性分离的目的。离开磁场后，磁性标记细胞不再受磁场作用，就可以被洗脱下来(图 1.2)。

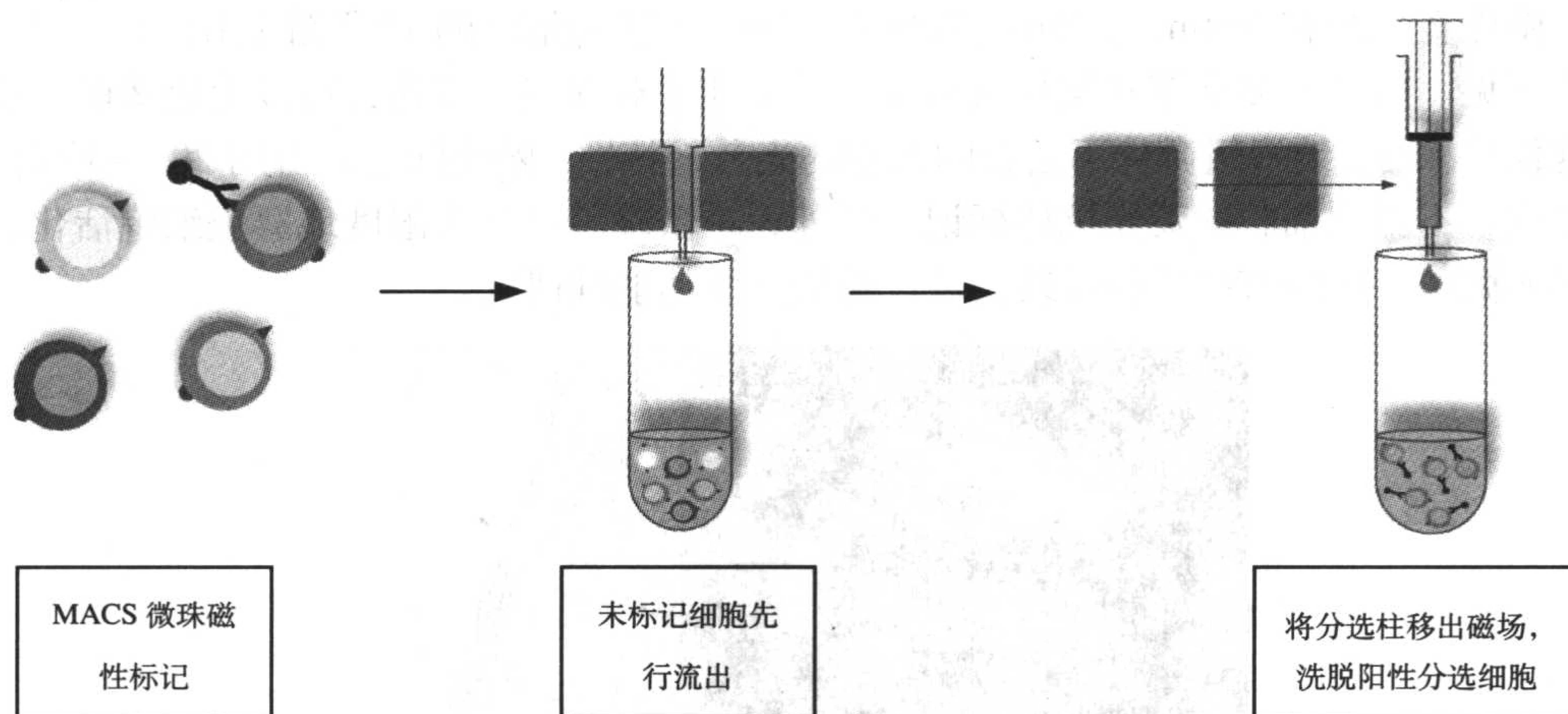


图 1.2　MACS 技术原理

MACS 技术的优点

1) 纯度高、回收率高，可重复性好

使用 MACS 技术，可获得高纯度、高回收率的分选细胞群，不仅可获得常见的细胞(如 T、B、NK 细胞和单核细胞)，甚至可获得罕见的细胞(如干细胞、分泌细胞因子的 T 细胞亚群、树突细胞亚群)，获得的纯度可高达 90%~99%。

2) 对细胞无损伤

MACS 微珠和 MACS 分选柱均无毒性，对细胞无损伤，可以纯化有活力和有功能活性的细胞。

3) 操作简便

MACS 技术设备小巧，操作简单，适用于在任一实验室分选各种细胞。磁珠孵育时间很短，仅需 15min。手动分选可在 30min 内完成，自动仪器分选可在 3~10min 之内完成。

4) 从实验室到临床

通过使用不同型号的分选柱和分选器，MACS 技术可以实现从 10^5~10^{11} 个细胞的分选。如果使用频率高，可选用自动磁性细胞分选仪 autoMACS；若在密闭的系统内无菌分选细胞，可选用 CliniMACS。

5) 分选后细胞适用于后续实验

流式细胞术、显微镜分析和分子生物学研究显示 MACS 分选对细胞没有影响。分选后细胞适用于细胞培养和体内实验。此外，不论使用阳性分选还是去除分选，分选得到的标记细胞组分和未标记细胞组分均可回收利用。

1.3.1.1 MACS 微珠

MACS 微珠(microbead)是一种与高度特异性单克隆抗体相耦联的超顺磁化微粒，用于目的细胞或者去除细胞的磁性标记。

1) MACS 微珠的特性

微珠直径约有 50nm，是细胞直径的 1/200，体积为细胞的 10^{-6}(图 1.3)，光学显微镜下不可见。微珠由多聚糖和氧化铁组成，无毒性，对细胞无损伤，可以生物降解。流式细胞仪检测时，纳米级微珠不会影响细胞的光散射特性；磁性标记只占用 20%~30%的结合位点，不影响细胞的荧光抗体标记。此外，小微珠可以最大限度地避免细胞活化，无需解离微珠，可以直接进行后续实验，包括细胞功能性研究。

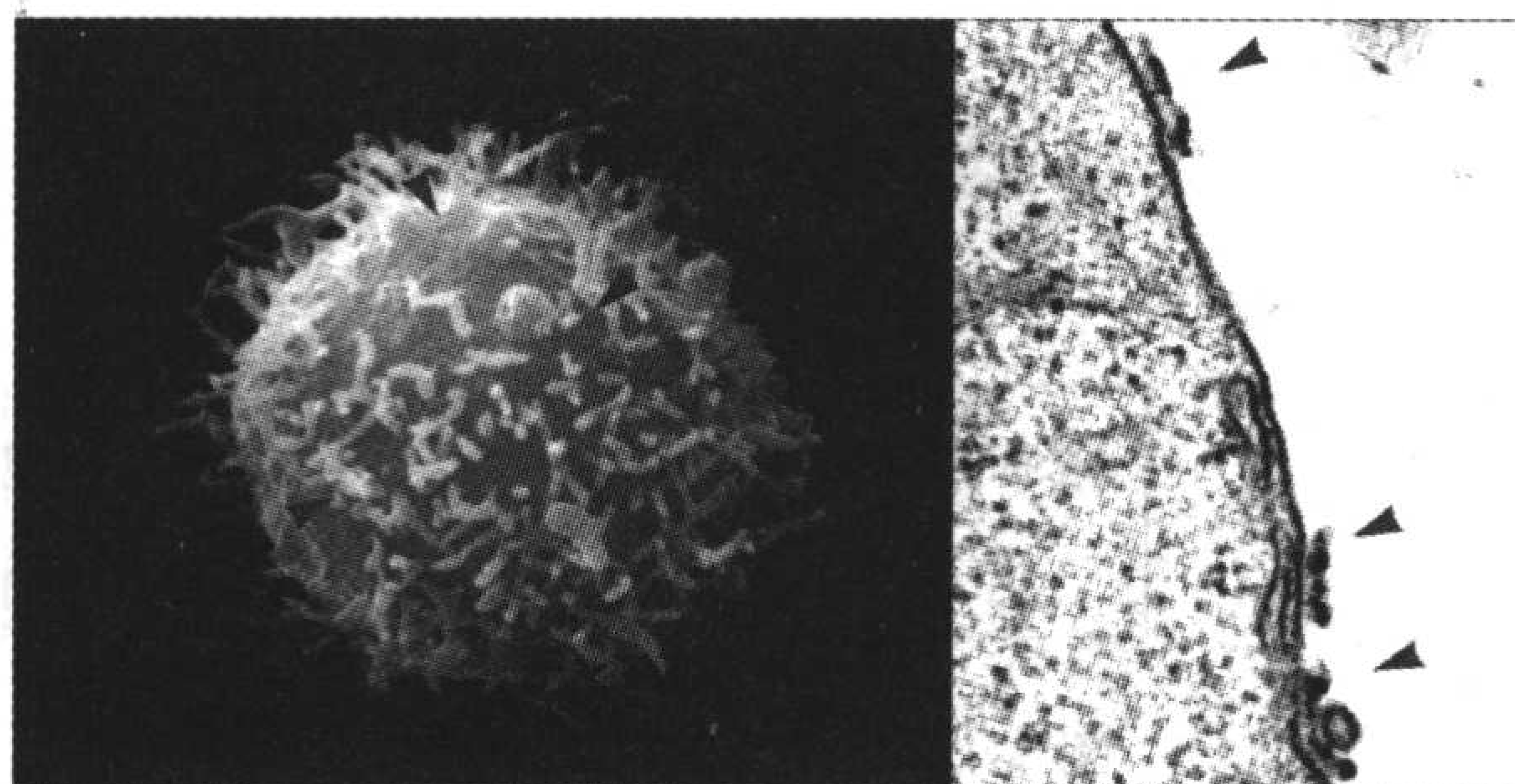


图 1.3 MACS 技术分选的细胞

箭头所示为磁性结合在细胞表面的微珠(图片由德国美天旎生物技术公司提供)

2) MACS 微珠的种类

MACS 微珠主要有三种：直标微珠(direct microbead)、间标微珠(indirect microbead)、多选微珠(multisort microbead)。

(1) 直标微珠：微珠直接与高度特异性的单克隆抗体相耦联，通过抗原抗体反应识别并对表达相应抗原的细胞磁性标记。用于人类干细胞分选的直标微珠主要有 CD34 微珠、CD133 微珠、CD117 微珠、CD105 微珠，用于小鼠干细胞分选的直标微珠主要有抗 Sca-1 微珠、CD117 微珠。

(2) 间标微珠：微珠不直接与特异性抗体相耦联，而是通过识别一类具有共同性质的一抗来对一抗结合的细胞磁性标记。一抗可以是未标记抗体、生物素化抗体或与荧光素结合的抗体，然后分别用结合有相应的抗一抗抗体的微珠(抗免疫球蛋白微珠、抗生物素微珠或链霉亲和素微珠、抗荧光素微珠)，对一抗结合的细胞进行磁性标记。

(3) 多选微珠：多选微珠是专门为分选细胞亚群研制的，微珠通过特殊的方式与抗体耦联，在第一次阳性分选完成后，与细胞结合的多选微珠可以被一种解离试剂剪切下来，阳性分选的细胞可以进行再次阳性分选或者去除分选。

1.3.1.2 MACS 分选柱

由于 MACS 微珠非常小，因此需要高强度梯度磁场来滞留标记细胞，MACS 分选柱(separation column)可以帮助产生强大的磁场，同时维持细胞的活性和功能。

1) MACS 分选柱特性

MACS 分选柱是一类填充有不同规格铁珠的塑料容器，铁珠表面有亲水包被，因此不会损伤细胞。MACS 分选柱本身不带有磁性，但是当置于一个永久性磁场——MACS 分选器中时，分选柱内的铁珠可以使分选器磁场增强 1000 倍，足以滞留仅标记有极少量微珠的目的细胞；铁珠的存在使磁性标记细胞从分选柱中通过时受到均匀的磁力作用，从而提高分选纯度和回收率。

2) MACS 分选柱的种类

根据分选柱的容量、用途、操作方式、使用范围，将分选柱分为以下 11 种：MS 分选柱、大细胞分选柱、LS 分选柱、XS 分选柱、LD 分选柱、CS 分选柱、D 分选柱、AutoMACS 分选柱、CliniMACS 分选柱及管道系统、μ分选柱、M 分选柱。

1.3.1.3 MACS 分选器

MACS 分选器(MACS separator)由永久性磁铁和支架构成，与分选柱一起形成高强度的梯度磁场。根据应用范围分为研究用和临床应用的 MACS 分选器，根据操作方式分为手动和自动分选器。不同的分选器需要使用相应的分选柱(表 1.2)。

表 1.2　MACS 技术所用的不同类型的分选器与分选柱

分选种类	分选柱	容量	适配分选器
手动阳性分选或者强标记细胞的去除分选	MS 分选柱	2×10^8 个总细胞 10^7 个标记细胞	MiniMACS、OctoMACS、VarioMACS、SuperMACS
	大细胞分选柱	2×10^8 个总细胞 10^7 个标记细胞	MiniMACS、OctoMACS、VarioMACS、SuperMACS
	LS 分选柱	2×10^9 个总细胞 10^8 个标记细胞	MidiMACS、QuadroMACS、VarioMACS、SuperMACS
	XS 分选柱	2×10^{10} 个总细胞 10^9 个标记细胞	SuperMACS
手动去除分选	LD 分选柱	5×10^8 个总细胞 10^8 个标记细胞	MidiMACS、QuadroMACS、VarioMACS、SuperMACS
	CS 分选柱	2×10^8 个标记细胞	VarioMACS、SuperMACS
	D 分选柱	10^9 个标记细胞	SuperMACS
自动分选	AutoMACS 分选柱	4×10^9 个总细胞 2×10^8 个标记细胞	自动磁性细胞分选仪 AutoMACS
	CliniMACS 分选柱及管道系统	6×10^{10}~12×10^{10} 个总细胞 12×10^8~6×10^{10} 个标记细胞	临床级磁性细胞分选仪 CliniMACS
分子生物学分选	μ分选柱	10μg mRNA	μMACS
	M 分选柱	50μg mRNA	MiniMACS、OctoMACS、VarioMACS、SuperMACS

1.3.2 分选前标本制备

MACS 技术可以使用的细胞来源很广泛，包括人类的外周血、骨髓、脐带血、冷冻保存的外周血和骨髓、淋巴结、扁桃腺、肿瘤组织、体腔液，小鼠的脾脏、骨髓、胎肝、胸腺、淋巴结，其他动物以及其他种类的细胞(如培养细胞、大脑细胞、皮肤细胞等)。

由于细胞团块和死细胞的存在一方面会堵塞分选柱，降低分选效率，另一方面会与磁珠非特异性结合，造成分选后细胞纯度降低。因此分选前的标本制备是一个很重要的

环节。标本制备方法主要包括密度梯度离心、组织消化法(机械分离、生物化学分离)、过滤、裂解红细胞。

1.3.2.1 密度梯度离心

密度梯度离心是最常用的标本制备方法，使用的试剂主要有 Ficoll 液和 Percoll 液。具体方法参见 1.1 节。

1.3.2.2 组织消化法(机械分离、生化分离)

组织标本的 MACS 分选中，一个很重要的问题就是如何成功获得单细胞悬液。操作中可能会用到机械分离和酶分离方法，前者包括切割和钢网研磨，后者包括 EDTA(如黏附的培养细胞)和酶(胰蛋白酶、胶原酶、解离酶)消化方法。做酶消化时要考虑到是否会损坏用来做磁性标记的细胞表面抗原。如果标本中含有大量死细胞，则需要使用含有 DNA 酶的缓冲液。具体方法参见 1.5 节。

以胶原酶 D 处理小鼠脾细胞为例：

(1) 在直径 6cm 的平皿内加入足以覆盖底部的胶原酶 D(大约 5ml)，把小鼠脾脏放入平皿中。

(2) 使用 1ml 注射器和 25G 针头将 500μl 胶原酶 D 注入小鼠脾脏。

(3) 用剪子和镊子将小鼠脾脏剪成小片。

(4) 37℃条件下将小鼠脾脏碎片在 5ml 胶原酶 D 中孵育 45~60min。

(5) 将剩余的组织和胶原酶 D 消化的细胞在钢网上研磨过滤。

(6) 将所有细胞收集在 50ml 试管中，计数。加入缓冲液直至终体积为 15ml，200*g* 离心 10min，用生理盐水或 PBS 洗涤细胞。

(7) 小心地去除上清，按照说明书调整体积。

1.3.2.3 过滤

为了去除组织团块和黏附成团的细胞，得到单细胞悬液，需要进行过滤。一般血细胞大小为 7~20μm，因此建议在分选前使用 30μm(400 目左右)滤网对标本进行过滤。

1.3.2.4 裂解红细胞

(1) 在 1 倍体积的细胞悬液中加入 5~10 倍体积的红细胞裂解缓冲液，室温下孵育 5min。

(2) 20℃、300*g* 离心 10min，小心地去除上清。

(3) 加入缓冲液洗涤 2 次，20℃、200*g* 离心 10min，小心地去除上清。

(4) 在适当的缓冲液内重悬细胞，计数并进行磁性标记。

1.3.3 MACS 标记与分选策略

1.3.3.1 MACS 标记策略

应用 MACS 技术进行分选最重要的一点是高质量的标记。要应用标记策略(labeling

strategy)尽可能地增强阳性细胞的标记，并减弱背景染色。有两种基本的磁性标记方式：直接标记和间接标记，均可用于 MACS 复合分选策略中。

1) 直接标记(以 CD133 微珠直接磁性标记为例)

(1) 从人类抗凝全血提取 PBMC，或者标准方法准备骨髓和脐带血。建议使用 Ficoll-Paque 液密度梯度离心去除死细胞。通过 30μm 滤器或者 400 目滤网去除细胞团块。

(2) 将每 1×10^8 个总细胞在 300μl 缓冲液中重悬，加入 100μl FcR 阻断剂，目的是抑制与非靶细胞的非特异性结合或者 Fc 受体介导的抗体结合。

注意：1×10^8 个细胞以下使用相同容量，1×10^8 细胞以上的所有试剂和溶液体积相应成倍增加。如 2×10^8 个细胞在 600μl 缓冲液中重悬，加入 200μl FcR 阻断剂。

(3) 加入 100μl CD133 微珠标记细胞，终体积为每 1×10^8 个细胞 500μl。

注意：增加 CD133 磁珠的用量可能会导致与非靶细胞的非特异性结合；也可能在使用同一特异性抗体进行荧光染色时，降低抗体的荧光强度。

(4) 混匀，4~8℃孵育 30min。

注意：温度较高以及磁性标记和染色时间较长都会导致非特异性细胞标记。

(5) (可选择)为了使用流式细胞仪或者荧光显微镜检验磁性分选的效率，按照说明书中的推荐浓度加入荧光素结合抗体，孵育 5~10min。

(6) 加入标记体积 10~20 倍量的缓冲液洗涤细胞，300*g* 离心 10min。

(7) 完全去除上清，每 1×10^8 个细胞用 500μl 缓冲液重悬(如果少于 1×10^8 个总细胞，也至少用 500μl 缓冲液重悬)，然后进行 MACS 分选。

2) 间接标记(以抗 FITC 微珠为例)

(1) 在标本制备和细胞计数后离心细胞样本，重悬细胞沉淀，一般每 1×10^7 个总细胞用 100μl 缓冲液重悬，加入 10μl FITC 结合抗体。

(2) 将细胞混匀，按照操作手册的推荐在 6~12℃条件下孵育 5~10min。

(3) 加入容量为染色体积 10~20 倍的缓冲液洗涤细胞，300*g* 离心 10min，不要破坏细胞沉淀，完全去除上清。

(4) 重悬细胞沉淀，每 1×10^7 个总细胞加入缓冲液 90μl。如果细胞量较多，根据总细胞数相应增加缓冲液量(如 5×10^7 个总细胞用 450μl 缓冲液重悬)。

(5) 每 1×10^7 个总细胞中加入 10μl MACS 抗 FITC 微珠，因此每 1×10^7 个总细胞的终体积为 100μl，抗 FITC 微珠体积与总标记体积的比例保持在 1∶10 这一点很重要。

(6) 混匀细胞，在 6~12℃条件下孵育 15min。

(7) 加入容量为标记体积 10~20 倍的缓冲液洗涤细胞，300*g* 离心 10min，仔细地完全去除上清。每 1×10^8 个总细胞在 500μl 缓冲液中重悬(如果少于 1×10^8 个总细胞，也至少用 500μl 缓冲液重悬)，然后进行 MACS 分选。

注意：抗 FITC 微珠仅限于使用 FITC 异构体-1 结合的一抗。大多数市售 FITC 抗体都是与 FITC 异构体-1 结合的。在与一抗孵育后，要非常仔细地洗涤细胞。如果未结合的一抗没有被完全去除，则可能会竞争性抑制 MACS 抗 FITC 微珠磁性标记细胞。使用链霉亲和素-生物素或者抗生物素-生物素磁性标记系统时，可以使用链霉亲和素-荧光素结合物进行荧光染色。当联合使用荧光素标记抗体与抗荧光素微珠时，可以直接进行流式细胞术分析，但是磁性标记后可能会使荧光素标记抗体的荧光强度减弱。

1.3.3.2 MACS 分选策略

有两种基本的分选策略(separation strategy)：阳性分选和去除分选。复合分选策略是将两种基本分选策略相结合或者联合使用多选微珠，从而实现细胞亚群的分选。

1.3.3.2.1 阳性分选

阳性分选(positive selection)是利用针对靶细胞的高度特异性单克隆抗体分选相应细胞的方法，目的细胞被磁性标记后，可作为阳性标记组分直接分选出来。分选后的细胞不必去除 MACS 微珠。该方法最直接、最特异，尤其适用于富集稀有的细胞，如 CD34、CD133 阳性造血干细胞。

以阳性分选 $CD133^+$细胞为例：

1) 试剂和仪器

磁性细胞分选器；阳性分选柱；缓冲液：PBS(磷酸盐缓冲液)pH7.2，含有 0.5% BSA(牛血清白蛋白)和 2mmol/L EDTA；(建议)荧光素结合的 CD133/2 抗体。

2) 使用 CD133 微珠进行细胞磁性标记

见直接标记。

3) 磁性分选(以手动阳性分选柱分选为例)

(1) 选择 MS 柱(从 2×10^8 个总细胞中分选出 1×10^7 个磁性标记细胞)或者 LS 柱(从 2×10^9 个总细胞中分选出 1×10^8 个磁性标记细胞)，放置在相应 MACS 分选器的磁场中。

(2) 用适量缓冲液润湿分选柱：MS 柱，500μl；LS 柱，3ml。

(3) 将制备好的细胞悬液加入分选柱中：MS 柱，500~1000μl；LS 柱，1~10ml。阴性细胞成分先行流出。

(4) 用适量缓冲液冲洗分选柱 4 次：MS 柱，4×500μl；LS 柱，4×3ml。

(5) 将分选柱移出分选器，放置在适当的采集管上。

(6) 在分选柱内加入适量缓冲液(MS，1ml；LS，5ml)，用分选柱配备的活塞迅速推出磁性标记细胞。

(7) 为了提高分选纯度，需要进行二次分选。即将洗脱下来的阳性细胞加入一个新的阳性分选柱，重复上述分选步骤。

1.3.3.2.2 去除分选

去除分选(depletion)是把非目的细胞磁性标记后再从细胞混合物中去除的方法，即未磁性标记的细胞为目的细胞。使用去除分选策略，使所有非目的细胞均被磁性标记，滞留在分选柱上，而靶细胞流出分选柱，在非磁性标记成分中收集。去除分选策略适用范围：去除不需要的细胞，缺乏针对目的细胞的特异性抗体，不需要抗体和目的细胞结合，复合分选的一部分。

以小鼠系别细胞去除试剂盒进行阴性分选为例：

(1) 系别细胞去除试剂盒是一种可从外周血中去除成熟造血细胞(包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞/巨噬细胞、粒细胞、红系细胞及其定向前体细胞)的磁性标记系统。细胞与一系列生物素化的抗系别抗原[包括 CD5、CD45R(B220)、CD11b、*anti*-Ly-6G(Gr-1)、7-4 和 Ter-119]抗体和抗生物素磁珠共同孵育，磁性标记后去除系别细胞。这种标记过程保留了系别标志阴性的细胞，可以根据 CD117 或 Sca-1 的表达对这些细胞做进一步的磁

性分选。

(2) 用适当方法处理小鼠骨髓，并计数。每 1×10^7 个总细胞用 40μl 缓冲液重悬。

(3) 每 1×10^7 个总细胞加入 10μl 生物素化抗体混合物。

(4) 混匀，4~8℃孵育 10min。

(5) 每 1×10^7 个总细胞加入 30μl 缓冲液及 20μl 抗生物素微珠。

(6) 混匀，4~8℃孵育 15min。

(7) 加入标记体积 10~20 倍量的缓冲液洗涤细胞，300*g* 离心 10min。

(8) 完全去除上清，每 1×10^8 个细胞用 500μl 缓冲液重悬(如果总细胞少于 1×10^8 个，也至少用 500μl 缓冲液重悬；如果细胞数超过 10^8 个，缓冲液量相应成倍增加)，然后进行 MACS 分选。

注意：上述所有操作都应该在冰上进行。快速操作、保持细胞低温、使用预冷溶液，都会有助于避免在细胞表面形成抗体封闭效应以及非特异性标记。

(9) 选择 MS 柱(从 2×10^8 个总细胞中去除 1×10^7 个磁性标记细胞)或者 LS 柱(从 2×10^9 个总细胞中去除 1×10^8 个磁性标记细胞)，放置在相应 MACS 分选器的磁场中。

(10) 用适量缓冲液润湿分选柱：MS 柱，500μl；LS 柱，3ml。

(11) 将用相应缓冲液重悬的细胞悬液加入分选柱中。

(12) 收集先行流出的未标记细胞组分，这些是富集的系别阴性细胞。

(13) 用适量缓冲液冲洗分选柱：MS 柱，3×500μl；LS，3×3ml。洗脱液也作为系别阴性细胞成分收集起来。

(14) (可选择)在磁场外将分选柱上滞留的细胞洗脱下来，这些细胞是磁性标记的系别阳性细胞。

1.3.3.2.3 复合分选策略

联合使用两种以上分选策略，主要用于细胞亚群分选或者用于得到高纯度的非常稀有的细胞。

1) *去除后再阳性分选*(depletion followed by positive selection)

细胞亚群的分选，可以先去除非目的细胞，再磁性标记阳性分选细胞。如果非目的细胞也表达用来阳性选择目的细胞的抗原，就需要先去除这群非目的细胞；要分选非常稀有的细胞，如先从细胞悬液中去除非目的细胞，在富集细胞的基础上，进行阳性分选，可获得高纯度的目的细胞。

以小鼠系别细胞去除试剂盒去除分选后再使用 CD117 磁珠阳性分选为例(图 1.4)：

(1) 对小鼠系别细胞去除分选后得到的系别阴性细胞进行计数，每 1×10^7 个总细胞用 80μl 缓冲液重悬，每 1×10^7 个总细胞加入 20μl CD117 微珠。

(2) 混匀，4~8℃孵育 15min。

(3) 每 1×10^7 个总细胞用 1ml 缓冲液洗涤细胞，300*g* 离心 10min。

(4) 完全去除上清，每 1×10^8 个细胞用 500μl 缓冲液重悬。

(5) 进行阳性分选。

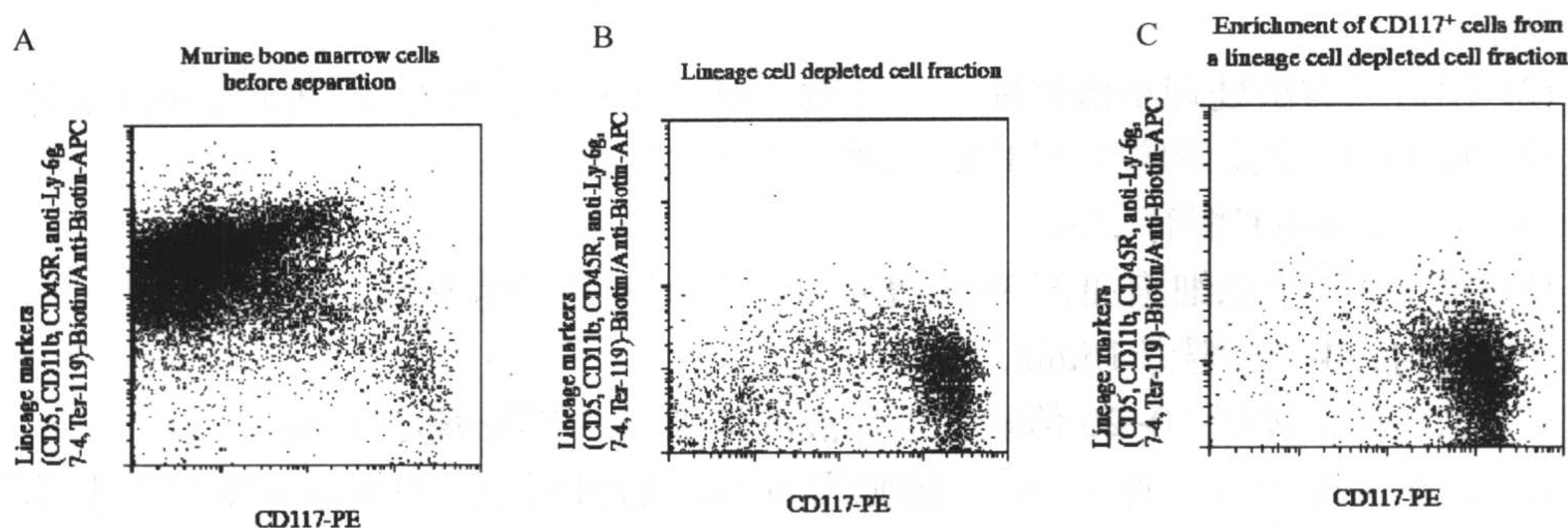


图 1.4 使用小鼠系别细胞去除试剂盒和 CD117 微珠分选得到的小鼠骨髓系别阴性/CD117$^+$细胞

A 图为分选前细胞；B 图为系别细胞去除分选后的细胞成分；C 图为复合分选后得到的系别阴性/CD117$^+$细胞

2) 多重分选策略(multisort strategy)

MACS 多重分选是一种根据多种表面标志磁性分选细胞的技术。多重分选中，首先用 MACS 多选微珠标记目的细胞，进行第一参数阳性分选。再用多选解离试剂将微珠从抗体上酶性解离下来。接着使用针对另一细胞表面标志的抗体-微珠复合物对阳性分选细胞磁性标记。二次标记的细胞可以再次进行阳性分选或者去除分选。

以 CD34$^+$/HLA-DR$^-$的 CD34 细胞亚群分选为例(图 1.5)：

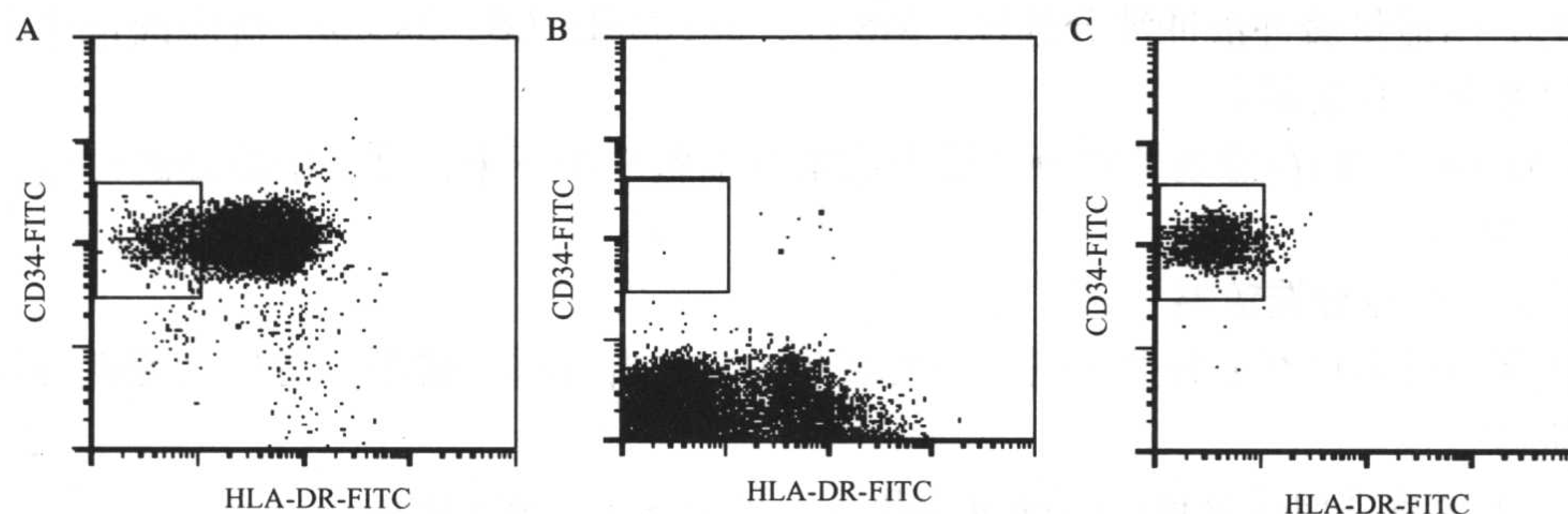


图 1.5 使用 CD34 多选试剂盒和 HLA-DR 微珠从 PBMC 中分选得到的 CD34$^+$ HLA-DR$^-$细胞

A 图为分选前细胞；B 图为 CD34 多选微珠分选后细胞；C 图为复合分选后得到的 CD34$^+$ HLA-DR$^-$ 细胞

(1) 从抗凝外周血、骨髓、脐带血中分离出单个核细胞，计数，用缓冲液重悬细胞，调节体积为每 600μl 中有 2×10^8 个细胞。

(2) 在细胞悬液中加入 200μl FcR 阻断剂，目的是抑制非特异性结合或者 CD34 多选微珠的 Fc 受体与非靶细胞结合，再加入 200μl CD34 多选微珠磁性标记细胞，混匀后 6~12 ℃孵育 30min。

(3) 按照说明书推荐的剂量加入 100μl CD34-PE(HPCA-2)，4~8℃避光孵育 10min。

(4) 加入 1ml 缓冲液洗涤细胞，300*g* 离心 10min，完全去除上清，在 500μl 缓冲液中重悬。取出少量细胞进行流式细胞仪检测。

(5) 连续使用两个分选柱进行阳性分选。

(6) 分选后阳性细胞内每 1ml 加入 20μl MACS 多选解离试剂，6~12℃ 孵育 10min，使用一个新的 MS 柱去除剩余的磁性标记细胞。

(7) 洗涤细胞，完全去除上清，在缓冲液中重悬细胞，终体积为 40μl。

(8) 每 40μl 细胞悬液中加入 60μl MACS 多选终止试剂，混匀，再加入 100μl HLA-DR 微珠，6~12℃孵育 15min。

(9) 按照说明书推荐的剂量加入 HLA-DR-FITC，4℃冰箱内孵育 10min。

(10) 根据 HLA-DR 的表达，使用一个新的 MS 柱进行分选。

1.3.4 MACS 分选结果的评定

为了评价 MACS 分选效率，分选后细胞要分析其纯度、回收率和活性。MACS 微珠可以在对细胞进行磁性标记同时进行荧光素结合抗体染色。多数情况下可以使用相同的特异性抗体。染色细胞可以进行流式细胞仪分析、荧光显微镜分析或者其他技术分析。

1.3.4.1 细胞回收率

多数情况下，分选后细胞数要与不同细胞群中理论上分选出的细胞数进行比较。为了计算靶细胞回收率，在开始 MACS 分选前应从 MACS 标记成分中取出一部分细胞。

$$\text{回收率}(\%)=\frac{\text{阳性成分细胞数}\times\text{阳性成分中阳性细胞百分比}}{\text{分选前标本中细胞数}\times\text{分选前标本中阳性细胞百分比}}\times 100\%$$

$$\text{总细胞回收率}(\%)=\frac{\text{阳性成分细胞数}+\text{阴性成分细胞数}}{\text{分选前标本中细胞数}}\times 100\%$$

注意：分选前细胞数的计算，应在磁性标记后、磁性分选前取出一部分细胞，以便于分析是由于离心还是由于磁性分选造成的细胞丢失。此外，也要将计数统计学因素考虑进去。

1.3.4.2 分选细胞的纯度

大多数试验在分选后要计算分选细胞的纯度。我们建议使用流式细胞仪分析细胞。此外，也可以使用荧光显微镜或者免疫细胞化学方法来进行分析。

阳性分选细胞成分的纯度为阳性成分中阳性细胞的百分比；

去除分选细胞成分的纯度为阴性成分中阴性细胞的百分比。

注意：细胞的高质量染色是精确分析的前提。应确定使用的分析方法足够敏感以进行精确纯度分析。此外，检测的细胞数也很重要，尤其是使用流式细胞仪检测时，上样细胞量应为 2×10^5~2×10^7 个，并且要注意每管之间要冲洗进样针，否则进样针或者管道内残余细胞或者其他颗粒会影响分选结果验证的准确性。

1.3.4.3 细胞活性

通过有些染色技术可以鉴别活细胞和死细胞。通过光学显微镜检查最常用的鉴别方法是台盼蓝染色，原理是台盼蓝会渗透入死细胞的细胞膜，将它们染成蓝色。通过流式细胞仪和荧光显微镜检查最常用的是碘化丙锭(PI)(5.0μl/ml)染色。PI 可以透过死细胞的

细胞膜，与 DNA 双螺旋相结合。因此，死细胞的细胞核会被荧光染色。根据流式细胞仪的特性(即激光的激发波长，UV 激发能力)还可以选用其他激光染料(如 DAPI 或者 Hoechst33342)。

$$活性(\%)=\frac{活细胞数}{总细胞数(活细胞+死细胞)}\times 100\%$$

1.3.5 人类干/祖细胞分选

随着造血干细胞移植和再生医学研究的深入发展，干/祖细胞分选应用越来越广泛。最早的临床型分选——CliniMACS 分选就是从 $CD34^+$细胞分选开始的。目前越来越多的人类和小鼠干/祖细胞分选技术为从事基础研究和临床研究的学者提供了更加便利的工具。

1.3.5.1 研究用干/祖细胞分选

1.3.5.1.1 CD133 分选

CD133 是一种独特的干细胞标志，分子质量为 120kDa，具有 5 个跨膜区，曾命名为 AC133。2000 年，在英国 Harrogate 举行的第 7 届人类白细胞分化抗原国际工作会议(7th International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens，HLDA7)上被正式命名为 CD133。

CD133 抗原可被 3 种 CD133 抗体识别，即克隆 AC133、293C3 和 AC141。AC133 直接与 CD133/1 糖基化抗原表位结合，可用于从外周血、骨髓、脐带血及其他组织中分析和分选 $CD133^+$细胞。单克隆抗体 293C3 和 AC141 识别抗原表位 CD133/2，主要用于 MACS 分选后 $CD133^+$细胞的荧光染色。多数情况下 CD133/1 和 CD133/2 识别同种细胞，只是在表达强度上有差别，但是在骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome，MDS)和某些急性髓性白血病(acute myeloid leukemia，AML)中发现 CD133/1 和 CD133/2 表达不同，或者其正常表达强度紊乱(Green et al. 2000)。

造血系统中，CD133 表达于 35%~75%的 $CD34^+$细胞亚群上，主要见于人类胎肝、骨髓、脐带血、外周血中 $CD34^{bright}$ 干细胞和前体细胞，包括 $CD34^{bright}$、$CD38^{neg/dim}$、$HLA\text{-}DR^{neg/dim}$、$CD90^+$和 $CD117^+$细胞。此外，CD133 也见于这些组织的一小部分 $CD34^-$细胞，但在成熟的血细胞表面不表达。与 CD34 抗原不同的是，CD133 在晚期祖细胞表面，如前 B 细胞、红系集落形成单位(colony forming unit-erythrocyte，CFU-E)、粒系集落形成单位(colony forming unit-granulocyte，CFU-G)不表达。最近发现 CD133 也表达于内皮前体细胞、胎儿神经干细胞和发育中的上皮细胞。

1.3.5.1.2 CD34

CD34 抗原是一种单链跨膜糖蛋白，在人造血祖细胞和大多数内皮细胞表面表达。MACS CD34 分选试剂盒包含 FcR 阻断剂和结合鼠抗人 CD34 抗体(QBEND/10)的微珠。MACS 技术分选的 $CD34^+$前体细胞已用于多种细胞分化的相关研究(例如，树突细胞的扩增)、集落形成和表面标志表达的研究。

CD34 多选试剂盒可用于造血祖细胞的多重分选。首先从外周血、骨髓或脐带血中阳性分选出 $CD34^+$细胞；然后将多选微珠从细胞上解离下来；接着对分选后细胞进行再次标记和分选，如 HLA-DR、CD4、CD10、CD38、CD45RA、CD61、CD71、CD90(Thy1)和 CD117 等，得到相应 CD34 细胞亚群。

1.3.5.1.3 CD117

CD117(又称为 c-kit、铁因子受体或干细胞因子受体)是一种具有酪氨酸蛋白激酶活性的细胞表面糖蛋白，分子质量 145kDa，此分子与细胞的信号传导、活化、增殖场有关。CD117 微珠可用于从骨髓中分选造血干细胞和间充质干细胞。

有 1%~4%的骨髓细胞可表达 CD117 分子。大部分 $CD117^+$的细胞表达 CD133(90%)和 CD34(50%~70%)，据报道，有一个细胞亚群还表达 CD105(<12%)。此外，在肥大细胞、黑色素细胞和 AML 的幼稚细胞上也有 CD117 表达。

从骨髓中分选出的 $CD117^+$细胞，除了具有造血分化潜能外，还具有分化为成骨细胞的潜能。因此，目前尤为关注 $CD117^+$细胞具有的体内外非造血细胞分化潜能。

1.3.5.1.4 CD45/GlyA 去除分选

通过 CD45/GlyA 去除分选(CD45/GlyA Depletion Kit)可以从骨髓中得到具有多向分化潜能的非造血干细胞。原理是应用一系列生物素化的 CD45 和 CD235a(血型糖蛋白 A)抗体混合物和抗生物素磁珠，去除其他细胞成分，从而富集多能干细胞。

研究发现在特定的培养条件下，这些多能干细胞可以分化为多种中胚层细胞(如血管形成细胞、成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞和造血支持基质)(Reyes et al. 2001)、内胚层细胞(如肝细胞)和外胚层细胞(如星形胶质细胞、少突细胞和神经细胞)(Zhao et al. 2002)，MACS 分选的 $CD45^-$/$CD235a^-$细胞可以用来研究这些细胞的分化能力。

Reyes 等(2002)使用 MACS 技术从成人骨髓中去除 $CD45^+$/$GlycophorinA^+$细胞，得到多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cell，MAPC)和中胚层祖细胞(mesodermal progenitor cell，MPC)。研究发现骨髓中分选出的 MAPC 和 MPC 在某种体外培养条件下，有分化为功能性内皮细胞的能力和可塑性。$CD45^-$/$GlyA^-$细胞表型为：$CD133^{+/low}$、$Flk1^{+/low}$，不表达 CD31(Pecam-1)、CD117、CD34。MAPC/MPC 生成的内皮祖细胞(血管母细胞)表型为：$CD133^+$、KDR^+、$CD34^+$、$CD117^+$、$PECAM\text{-}1^+$。

1.3.5.1.5 CD105

CD105 抗原是转化生长因子 TGF-β_1 和 TGF-β_3 的受体，主要表达于人类间充质干细胞(mesenchymal stem cell，MSC)，在成熟的内皮细胞、一些 B 系和髓系起源的白血病细胞上也有表达。CD105 微珠用于从骨髓中分选间充质干细胞和从内皮组织中分选内皮细胞。分选后的 $CD105^+$细胞可以用于间质形成和体外造血系统疾病的研究。

成人骨髓中 MSC 占 0.01%~0.001%，其功能如下：①自我更新和分化为多种组织；②植入多种器官，分化为相应特异性组织；③与 HSC 共植入时可以增强植活；④在免疫缺陷小鼠中植入肌肉退化区域，可向肌肉系分化；⑤在人类清髓性化疗后可再生骨髓微环境；⑥成骨不全的儿童进行异基因骨髓移植，由于植入了功能性供者 MSC，可以增加骨髓密度。Majumdar 等(2000)使用 CD105 微珠分选人类基质细胞，发现创伤或者疾病后骨髓来源的基质细胞可以在损伤部位重建软骨。细胞培养 14d 后进行培养扩增分析，98%的细胞为 $CD105^+CD45^-$，并且分选后细胞能够支持体外造血。

Campioni 等(2003)对未接受治疗的 AML 患者骨髓细胞进行体外培养，发现骨髓基质细胞有缺陷，表现为 CFU-F 数目减少，增殖能力降低。在体外经 VEGF 和 ECGS 刺激后，AML 患者 $CD105^+$细胞有转变为内皮样表型细胞的能力。

1.3.5.2 临床级干祖细胞分选

CliniMACS 系统可在临床上用于从外周血采集物、骨髓或脐带血中分选 $CD34^+$和 $CD133^+$的人类干/祖细胞。目前在造血干细胞移植领域，全世界各大血液及肿瘤治疗中心使用 CliniMACS 系统治疗了上万例淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、自身免疫病、实体瘤等疾病患者，取得了满意的临床效果。此外，研究者使用 CliniMACS 系统分选 T 细胞、NK 细胞、树突细胞(dendritic cell，DC)以做免疫治疗，以及在冠状动脉患者心肌内注射 $CD133^+$细胞以治疗心肌损伤，均取得了可喜的成果。

1.3.5.2.1 CliniMACS CD34 分选

CliniMAC 分选技术在富集 $CD34^+$细胞中显示出优越的性能，它不仅能够高度纯化干祖细胞(平均纯度高达 95%)，还可以去除三四个对数级的 T 细胞、B 细胞，以及在体外高效去除三四个对数级的肿瘤细胞。

在大剂量化疗后，可通过移植同种异基因或自体造血干祖细胞来重建造血功能和免疫功能。肿瘤的自体移植中，移植物中含有的肿瘤细胞是复发的主要因素，因此高纯度的干祖细胞移植可以有效避免肿瘤复发。现已有许多移植中心成功地使用 CliniMACS 纯化 $CD34^+$细胞进行自体移植，对非霍奇金氏淋巴瘤、乳腺癌和神经母细胞瘤患者进行了治疗，通过有效去除肿瘤细胞，明显降低了疾病复发率。此外，使用 CliniMACS 纯化 $CD34^+$细胞可以去除自体移植物中的 T 细胞，改善自身免疫病患者的免疫系统平衡失调。国内外多家移植中心已成功地使用了纯化的 $CD34^+$细胞自体移植治疗多种自身免疫病。

在异基因移植中，体外去除干细胞移植物中的 T 细胞(T 细胞去除或阳性选择干细胞)，可以有效降低相关半相合供者或无关供者干细胞移植 GVHD 的发生率和严重度，从而提高异基因造血干细胞移植的成功率，这在 HLA 高度不相合的单倍体移植中尤为重要。此外，通过有效去除 B 细胞，可以预防移植后 EBV 相关淋巴增殖性疾病的发生。

1.3.5.2.2 CliniMACS CD133 分选

在人们发现 CD133 是比 CD34 更早的造血干细胞标志后，CD133 分选就引起了人们更大的兴趣。研究发现在有些急性白血病中，肿瘤细胞表达 CD34 但不表达 CD133。CD133 分选是自体移植时体外净化神经母细胞瘤、ALL 和 AML 移植物的很好的方法。在对动员的外周血采集物进行 $CD133^+$祖细胞分选的同时，可以有效去除 T 细胞。因此，单独 $CD133^+$分选或联合 CD34 分选，已成为除 CD34 分选外的另一个可供选择的富集造血祖细胞、去除肿瘤细胞和(或)免疫效应细胞的方法。

Bonanno 等(2004)研究发现临床级分选脐带血 CD133 阳性细胞可以得到适量原始造血前体细胞，这些细胞具有很高的造血活性以及体外间充质细胞的潜能。

CD133 也是人类成血管细胞和非造血系统干细胞的一个很好的标志。为了改善缺血心肌中组织再生，Ghodsizad 等(2004)和 Stamm 等(2004)在给心肌梗死患者做冠状动脉搭

桥手术和激光心肌血运重建手术时，在心肌内注入自体骨髓来源的干细胞，剂量为 1.5×10^6~9.7×10^6 个细胞，纯度高达 97%。结果表明术中使用 CliniMACS 分选的 CD133 阳性细胞，可以有效改善血流灌注，挽救缺血心肌，增强左室功能，适用于择期手术和急诊血管重建手术。

1.3.6 动物干祖细胞分选

1.3.6.1 小鼠干祖细胞分选

1.3.6.1.1 Anti-Sca-1(Anti-Sca-1 microbead)

小鼠干细胞与人类不同，CD34 只见于少数干细胞亚群，因此不能使用 CD34 作为干细胞分选标志。Sca-1(干细胞抗原-1)是一个 18kDa 的 GPI 连接的 Ly-6 家族表面蛋白(Ly-6A/E)分子。抗 Sca-1 微珠能识别 Ly-6E.1 和 Ly-6A.2，这是 2 个 Ly-6A/E 等位基因在不同小鼠品系中表达的基因产物(Ly-6E.1：BALB/c，C3H，NZB；Ly-6A.2：C57BL，SJL，129，AKR)。Anti-Sca-1 微珠可用于从骨髓和胎肝中阳性分选出高纯度 Sca-1$^+$小鼠造血干细胞。

从骨髓中分选的 Sca-1$^+$细胞不仅具有造血细胞分化潜能，在体内还能分化成肝细胞。磁性分选得到的 Sca-1$^+$可用于多种研究，如生长因子/细胞因子对于祖细胞成熟的影响、分析骨髓移植排斥或诱导耐受的重建实验。

1.3.6.1.2 CD117(CD117 microbead)

CD117 分子表达于小鼠体内的大多数造血祖细胞，包括多能造血干细胞、定向髓系、红系和淋系前体细胞。CD117 微珠用于分选小鼠造血祖细胞。从骨髓中分选出的 CD117$^+$细胞，除了具有造血分化潜能外，还具有在体内分化为平滑肌细胞、肌细胞和内皮细胞的能力。此外，CD117 还表达于少数成熟的造血细胞中，如肥大细胞。从骨髓中分选出的小鼠 CD117$^+$细胞主要用于造血和非造血分化潜能的研究。

1.3.6.1.3 系别细胞去除(lineage cell depletion kit)

见去除分选策略。

1.3.6.2 大鼠干/祖细胞分选

Thy1.1 抗原是 1978 年(Goldschneider et al. 1978)以来被公认的大鼠造血干细胞标志。Shu 等(2004)使用小鼠抗大鼠 Thy1.1 单抗和大鼠抗小鼠 IgG 微珠间接分选大鼠造血干细胞。

(王　卉　南　雪)

1.4 流式细胞分选法

流式细胞仪(flow cytometer，FCM)是一项集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、计算机技术以及细胞荧光化学技术、单克隆抗体技术为一体的新型高科技仪器。概

括来说，流式细胞术就是对于处在快速直线流动状态中的细胞或颗粒进行多参数的、快速的定量分析和分选的技术。从开始设想到第一台仪器的问世，科技工作者进行了不懈的努力。随着各种相关技术的迅速发展，FCM 技术已经成为日益完善的细胞分析和分选的工具。与传统的细胞分析技术相比，其主要特点是：①测量速度快，可在 1s 内计测数万个细胞；②可进行多参数测量，可以同时分析细胞的包括物理、生物化学相关特性在内的多种特征，并具有明显的统计学意义；③既是细胞分析技术，又是精确的分选技术。FCM 目前发展的水平凝聚了半个世纪以来人们在这方面的心血和成果。

1.4.1 流式细胞仪的基本结构

流式细胞仪主要由 4 部分组成：液流系统、光学系统、电子系统、计算机系统，如果是分选型机器，则还包括分选系统。

1.4.1.1 液流系统

流式细胞仪的液流系统包括鞘液箱、废液箱、鞘液管、样本管、压力系统、流动室或喷嘴等组件。流动室(flow chamber 或 flow cell)是仪器的核心部件，被测样品在此与激光相交。流动室由石英玻璃钢制成，并在石英玻璃钢中央开一个长方形孔，供细胞单个流过，检测区在该孔的中心。流动室内充满了鞘液，鞘液的作用是将样品流环包住，鞘液流是一种稳定流动，样品流在鞘液的环包下形成流体力学聚焦，使样品流不会脱离鞘液流的轴线方向，并且保证每个细胞通过激光照射区的时间相等，从而得到准确的细胞荧光信息。

1.4.1.2 光学系统

光学系统包括激光光源及若干组透镜和滤光片。激光是一种相干光源，它能提供单波长、高强度及稳定性高的光照，是细胞微弱荧光快速分析的理想光源。激光光束在到达流动室前，先经过透镜，使其聚焦，形成几何尺寸约为 22μm×66μm，即短轴稍大于细胞的直径的光斑。这种椭圆形光斑的激光能量分布呈正态分布；为保证样品中细胞是一个一个分别受到光照并且受照强度十分一致，必须将样本流与激光束正交且相交于激光能量分布峰值处。

1.4.1.3 电子系统

经荧光染色的细胞受合适的激光激发后所产生的发射光是通过光电转换器转变成电信号而进行测量的。光电倍增管(PMT)最为常用。PMT 的响应时间短，仅为纳秒数量级；光谱响应特性好，在 200~900nm 的光谱区，光量子产额都比较高。光电倍增管的增益在 10^3~10^8 间可连续调节，因此对弱光测量十分有利。从 PMT 输出的电信号仍然较弱，需要经过放大后才能输入分析仪器。流式细胞仪中一般备有两类放大器。一类输出信号幅度与输入信号呈线性关系，称为线性放大器。线性放大器适用于在较小范围内变化的信号以及代表生物学线性过程的信号，如 DNA 测量等。另一类是对数放大器，即输出信号和输入信号之间呈常用对数关系。在免疫学测量中常使用对数放大器。因为在免疫分

析时常要同时显示阴性、阳性和强阳性三个亚群，它们的荧光强度相差 1~2 个数量级，而且在多色免疫荧光测量中，用对数放大器采集数据易于解释。此外其还有调节便利、细胞群体分布形状不易受外界工作条件影响等优点。

1.4.1.4 计算机系统

经放大后的电信号被送往计算机分析。多道的道数是和电信号的脉冲高度相对应的，也是和光信号的强弱相关的。对应道数的纵坐标通常代表发出该信号的细胞的相对数目。从多道分析器出来的信号再经模-数转换器输往微机处理器编成数据文件，或存储于计算机的硬盘和软盘上，或存于仪器内以备调用。计算机的存储容量较大，可存储同一细胞的 6~8 个参数。存储于计算机内的数据可以在实测后脱机重现，进行数据处理和分析，最后给出结果。

1.4.2 流式细胞仪分选原理

流式细胞仪的分选可以分为两类。一类由机械分选，采用捕获管来实现，如 BD 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪(图 1.6)，通过 catch tube 截获样本流中的靶细胞，由分选管来收集。另一类是通过电磁偏转板实现的流式分选，这是大多数高速分选的仪器采取的方式。由喷嘴射出的液柱被分割成一连串的小水滴，根据选定的某个参数由逻辑电路判明是否将被分选，而后由充电电路对选定细胞液滴充电，带电液滴将携带细胞通过静电场而发生偏转，落入收集器中；其他液体则被当作废液抽吸掉。稳定的小液滴是由流动室上的压电晶体在几十千赫的电信号作用下发生振动而迫使液流均匀断裂而形成的。一般液滴间距约为数百微米。实验经验公式 $f = v/4.5d$ 给出了形成稳定水滴的振荡信号频率。其中 v 是液流速度，d 为喷孔直径。由此可知使用不同孔径的喷孔及改变液流速度，都可能会改变分选效果。分选的含细胞的液滴在静电场中的偏转是由充电电路和偏转板共同完成的。充电电压一般选+150V，或−150V；偏转板间的电位差为数千伏。充电电路中的充电脉冲发生器是由逻辑电路控制的，因此从参数测定经逻辑选择再到脉冲充电需要一段延迟时间，一般为数十毫秒。精确测定延迟时间是决定分选质量的关键，仪器多采用移位寄存器数字电路来产生延迟，可根据具体要求予以适当调整。

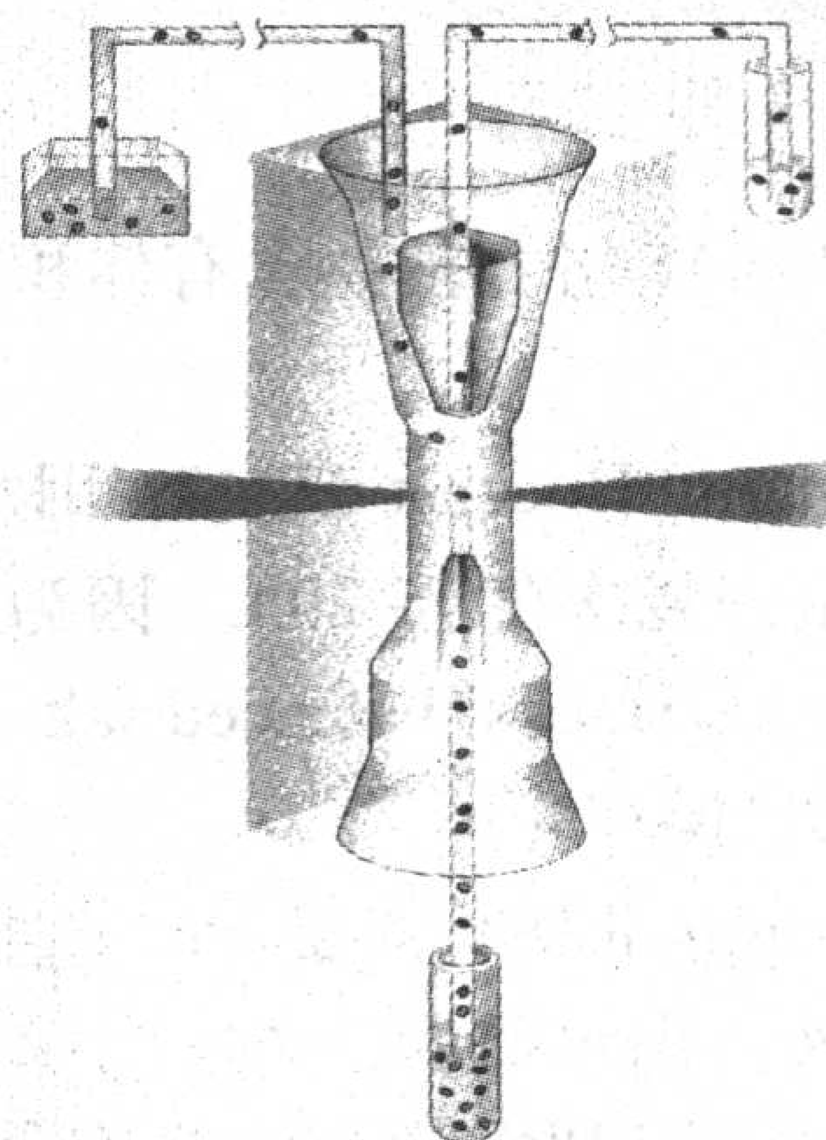


图 1.6 机械分选原理(图片由 BD 公司提供)

1.4.3 SP 细胞分选方法

1.4.3.1 分选原理

Hoechst-SP 细胞的分选纯化是干细胞纯化方案中的一部分。一些研究者利用某些单一的细胞表面标记，另一部分研究者则利用一些表面标记的组合及一些细胞特征，如利

用 SP 细胞有低荧光染色的特点来研究 SP 细胞。传统的方法是用单一波长，利用 Hoechst 染料能在干细胞内富集的特点来进行分选，虽然分选出的具有低 G_0 期的细胞群中通常都包含有 SP 细胞，但是不管是对多种细胞群或者是对 SP 细胞群，这种方法都不能很好地加以鉴别。所以在此我们用的是双波长的方法对 SP 细胞进行分析和分选。

研究表明在干细胞中只有 SP 细胞具有干细胞的活性，而且它们与其他的干细胞具有严格的同源性，因此 SP 细胞同样表达干细胞表面的一些标记。SP 细胞群表达低 Hoechst 33342 荧光，因为它们有与多药耐药(MDR) 类似的机制，即主动将染料泵出细胞外。而且有发现表明染料释出量和干细胞活性有直接的相关性。例如，位于 SP 细胞群最低位置处的细胞(有最强的染料释出的能力，所以结合的染料最少)表达有最强的干细胞活性。而且，SP 细胞对染色的条件具有高度的敏感性，因此，对干细胞中 SP 细胞进行分选纯化的优点在于，它对其他物种或者组织中的干细胞有潜在的应用价值。

1.4.3.2 实验材料

(1) DMEM 培养基：含有体积分数为 2%的胎牛血清，10mmol/L HEPES，4℃保存 4 周。

(2) 1mg/ml Hoechst 33342：用水溶解 Hoechst 33342，浓度为 1mg/ml，无菌过滤，用 1ml 的小瓶分装冻存于–20℃。因为 Hoechst 染料很便宜，所以不建议反复使用旧的染料。

(3) HBSS(Hanks' balanced salt solution)：含有体积分数为 2%的胎牛血清，10mmol/L HEPES，4℃保存 4 周。

(4) 200μg/ml 碘化丙锭(PI，选择使用)。

保存液：用水稀释，浓度为 10mg/ml，–20℃可冻存 12 个月。

工作液：用 PBS 以 1∶50 稀释成 200μg/ml，用铝箔避光 4℃保存 2 个月。最后在样本中的终浓度应为 2μg/ml。

(5) 5mmol/L 溶解于 95%乙醇中的异搏定(选择使用)。

(6) 骨髓细胞或来源于其他非骨髓组织的细胞。

(7) 37℃循环水浴箱。

(8) 250ml 或者 50ml 的聚丙烯离心管。

(9) 配备 UV 紫外激光(通常激光的激发波长在 351~364nm)及标准的 488nm 激光的流式细胞仪，还有相应的滤光片。

(10)细胞计数仪及相应的试剂。

1.4.3.3 实验方法

1) 细胞准备

(1) 用温度计检查水浴箱使水温精确保持在 37℃。在准备骨髓细胞时，将 $DMEM^+$ 培养基放在水浴箱中预热。对于非骨髓的其他组织，可以用蛋白酶，例如，用胰酶或胶原蛋白酶分解提取细胞，并计数细胞总量，使细胞浓度达到 10^6 个/ml。

(2) 尽可能仔细并且准确计数有核细胞的数量，最大可能地排除红细胞的干扰。红细胞呈盘状，比其他细胞小，在显微镜下，它们有时在对应的中间凹陷处出现黑点，以此可以与其他细胞区别。红细胞在骨髓细胞中约占 20%，如果不能通过肉眼将它们与有

核细胞区分开，可以使用一些溶解红细胞的方法将它们去除。在显微镜下分离完全的骨髓细胞以得到没有细胞团块的单个细胞的悬液。

(3) 4℃条件下，以 500g 的速度将骨髓细胞离心 5min，用预热的 DMEM$^+$培养基溶液在 250ml 聚丙烯离心管中重新悬浮细胞并混合均匀，使细胞浓度达到 10^6 个/ml。对于大量的骨髓细胞染色，250ml 聚丙烯离心管是最方便的，同样 50ml 离心管也可以使用。但是需要注意的是离心管的材质必须是聚丙烯，因为如果使用聚乙烯离心管，很多细胞会黏附在管壁上。

注意：有时收到人的骨髓标本的时间已经很晚，细胞制备和分选不能在同一天内进行，我们建议骨髓标本在用 Hoechst 染料染色前必须保存在 4℃过夜。这种方法只能在不可避免时使用，不能作为常规操作。到第二天早晨，再将骨髓加温至 37℃，重新悬浮成 10^6 个/ml 浓度的细胞悬液，然后再用 Hoechst 染料染色。为了证实流式细胞仪分析的细胞正是我们想要的细胞，可以事先保存一部分细胞，在加入 Hoechst 染料染色之前加入 50μmol/L 的异搏定，以阻断 Hoechst 在这部分 SP 细胞中的释出。用这部分 SP 细胞证实 SP 细胞门内 SP 细胞的存在。异搏定或者其他的 MDR 抑制剂可以减少染料从细胞中释出的速度。

2) Hoechst 33342 染色

(1) 加入 1mg/ml Hoechst 33342 使终浓度达到 5μg/ml，轻柔混合均匀。

(2) 将细胞在 37℃水浴箱中孵育 90min(以 C57Bl/6 小鼠为例)，确保水温保持在 37℃，在孵育过程中混匀离心管数次。由于染色对温度很敏感，因此建议使用专用水浴箱。

(3) 90min 后，将细胞以 500g 离心，用冰浴过的 HBSS 重新悬浮细胞，如果样本不准备用其他抗体做进一步染色，可以在冰的 HBSS 中加入 2μg/ml 的碘化丙锭，以鉴别死细胞。所有后续的操作必须在 4℃条件下进行，以防止 Hoechst 染料从细胞内释出。

注意：碘化丙锭的额外加入其实对于 SP 细胞分析不是必需的，但是却是有帮助的。因为 Hoechst 染料有时对骨髓细胞是有毒性的，而碘化丙锭可以排除死细胞的干扰。

(4) 这时，样本就可以直接在流式细胞仪上检测或者用其他抗体进行进一步染色以确定特定的 SP 细胞群。

注意：小鼠 85%的 SP 细胞均表达 Sca-1$^+$、c-Kit$^+$、CD45$^+$，而细胞系的标记如 CD34 表达阴性。我们推荐使用两种抗体进行染色，一种是大部分 SP 细胞表达阳性的抗体(Sca-1 或 c-Kit)，另一种是 SP 细胞不表达而其他大部分骨髓细胞表达阳性的抗体(Gr-1 或 B220)。所以推荐的抗体组合是 Sca-1-PE 和 Gr-1-FITC。人的 SP 细胞可以用 CD34 和其他标记来染色。

3) 流式细胞仪的设置

用配有分选功能的 BD FACSVantage 流式细胞仪分析和分选 SP 细胞，流式细胞仪必须配备能激发 Hoechst 33342 染料的紫外 UV 激光及相应的滤光片，以区分和接受染料发射的荧光。碘化丙锭在紫外条件下也能被激发，但是碘化丙锭染色是出现很亮的红光，而 Hoechst 33342 发出的是蓝光，因此很好区别。

4) 流式细胞仪上机分析

(1) 将经过 Hoechst 染色的细胞放置在流式细胞仪的上样位置，如有可能，用冷却

装置使其保持低温。没有必要在 FSC/SSC 参数的图中设门，而是用 Hoechst 红光(x 轴)和 Hoechst 蓝光(y 轴)作图，将参数设为线性，通过调节电压使红细胞位于左下角，死细胞(碘化丙锭染色时非常明亮的细胞)排列成水平的线状一直延伸到右侧，剩下的细胞位于中间。同时有必要通过去除右上角的细胞群将主要的 G_0、G_1 细胞群与 S-G_2/M 细胞区别开。

(2) 去除红细胞和死细胞，在已有的图中做活细胞门，然后收集活细胞门内 50 000~100 000 个细胞以更明确地确定 SP 细胞区域。

(3) 一旦通过抗体染色和(或)用前面提到的添加异搏定的方法确定了 SP 细胞的准确位置后，细胞就可以用标准的方法进行分选了，分选完的细胞收集在无菌的离心管中，可以进行后续的培养和转移。

1.5 组织消化法

对于人体组织而言，只有造血系统的细胞是单个存在的，而人体(动物体)内绝大多数的细胞是以组织的形式存在的，即细胞与细胞之间是紧密相连的，因此采用组织消化分散法将妨碍细胞生长的细胞间质包括基质、纤维等去除，使细胞分散，形成悬液，易于从外界吸收养分和排除代谢产物，这样就可以很快得到大量活细胞，细胞也可以在短时间内生长成片。对于存在于组织中的细胞的分离纯化，则必须先对其进行切碎、研磨、消化，才能获得单一存在形式的细胞，再附以其他的细胞分离方法，获得我们所需的目的细胞成分。

目前较为常用的消化试剂为胰蛋白酶和胶原酶。胰蛋白酶适用于消化细胞间质较少的软组织，如胚胎、上皮、肝脏、肾脏等组织，其消化效果与温度、pH 值、胰蛋白酶的浓度及组织块的硬度和大小有关。有时为了提高消化效果可以采用胰酶和 EDTA 联合消化的方法。由于 EDTA 是 Ca^{2+}、Mg^{2+}的螯合剂，而这些离子是维持组织完整的重要因素，因此将 EDTA 与胰蛋白酶以不同比例进行混合使用，效果较好。胶原酶(collagenase)是从溶组织梭状细胞芽孢杆菌提取制备的，分为 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型以及肝细胞专用胶原酶，要根据所要分离消化的组织类型选择胶原酶类型，如 II 型胶原酶可用于消化肝脏、骨、甲状腺等组织，III 型胶原酶对哺乳动物的组织有广泛的消化作用。由于胶原酶对细胞间质有消化作用而对上皮细胞影响不大，因此适用于消化分离纤维性组织、上皮及癌组织，可使上皮细胞与胶原分离而不受损害。

1) 实验材料及试剂

①眼科弯剪、组织镊、筛网(200 目)；②培养皿、培养瓶、离心管、吸管；③D-Hank 缓冲液高压灭菌，4℃保存；④胰蛋白酶或胶原酶；⑤完全培养基；⑥实验动物。

2) 操作方法

(1) 将组织块置于无菌培养皿中，用 Hank 缓冲液或无血清培养液漂洗，洗去血污，对于内脏组织要剥去外包膜。

(2) 用眼科弯剪将组织剪成 1~2mm^3 左右的小块。在剪切过程中，可以适当向组织上滴加少许培养液，以保持组织块的湿润。

(3) 根据组织的不同加入相应浓度的消化液，置于最佳消化条件下对组织进行消化

处理。要注意在消化过程中要随时吸取少量消化液置于显微镜下观察，如组织已经分散成细胞团或单个细胞就要终止消化。

(4) 将消化液过 200 目筛网，以去除组织块。剩余的大块组织可继续加入新鲜的消化液继续消化，以获得足量的目的细胞。

(5) 将已过滤的消化液置于离心管中，离心后，加入适量的 D-Hank 缓冲液或培养基重悬细胞，充分打散为单个细胞悬液，洗一二次后，细胞计数，接种于培养瓶或培养皿中，置 5% CO_2、37℃培养箱中进行培养。

3) 注意事项

不同的器官、组织，其组织胚胎学结构不一，例如，心肌细胞或平滑肌细胞如采用剪切的方法则容易将细胞损伤，在此情况下则需采用剥离加酶消化的方法。

(南　雪　裴雪涛)

主要参考文献

Bonanno G, Perillo A, Rutella S et al. 2004. Clinical isolation and functional characterization of cord blood CD^{133+} hematopoietic progenitor cells Transfusion，44(7): 1087~1097

Campioni D, Lanza F, Moretti S et al. 2003. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD^{105+} and $fibroblast^{+}$ stromal cells from AML: implications for their plasticity along endothelial lineage. Cytotherapy，5(1): 66~79

Ghodsizad A, Klein HM, Borowski A et al. 2004.Intraoperative isolation and processing of BM-derived stem cells. Cytotherapy，6(5): 523~526

Goldschneider I, Gordon LK, Morris RJ. 1978. Demonstration of Thy-1 antigen on pluripotent hemopoietic stem cells in the rat. J Exp Med, 148: 1351~1366

Green CL, Loken, M, Buck DD. 2000. Discordant expression of AC133 and AC141 in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myelogenous leukemia (AML) Leukemia, 14: 770~772

Majumdar MK, Banks V, Peluso P et al. 2000. Isolation，characterization，and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. J cell Physiol, 185: 98~106

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B et al. 2002. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J Clin Invest, 109: 337~346

Reyes M, Lund T, Lenvik T et al. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal uman marrow mesodermal progenitor cells. Blood，98: 2615~2625

Shu SN，Wei L, Wang JH et al. 2004. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. World J Gastroenterol, 10(19): 2818~2822

Stamm C, Kleine HD, Westphal B et al. 2004. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. Thorac Cardiovasc Surg，52(3): 152~158

Zhao LR，Duan WM，Reyes M et al. 2002. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ishemic brain of rats. Exp Neurology, 174: 11~20

第 2 章　干细胞的鉴定

2.1　光学显微镜

随着科学技术的进步，人们越来越需要对微观世界进行观察，显微镜正是完成这项工作所必需的设备，它突破了人类的视觉极限，使之延伸到肉眼无法看清的细微结构。显微镜是从 15 世纪开始发展起来的，从在简单的放大镜的基础上设计出来的单透镜显微镜，到结构复杂的复式显微镜，以及相差、荧光、偏光显微观察方式的出现，使显微镜更广泛地应用于医学、生物学、金属材料、化工等领域。

2.1.1　显微镜的基本光学原理

2.1.1.1　折射和折射率

光线在均匀的各向同性介质中，两点之间以直线传播，当通过不同密度介质的透明物体时，则发生折射现象，这是由于光在不同介质的传播速度不同造成的。当与透明物面不垂直的光线由空气射入透明物体(如玻璃)时，光线在其界面改变了方向并和法线构成折射角。

2.1.1.2　透镜的性能

透镜是组成显微镜光学系统的最基本的光学元件，物镜、目镜及聚光镜等部件均由单个和多个透镜组成。依其外形的不同，可分为凸透镜(正透镜)和凹透镜(负透镜)两大类。当一束平行于光轴的光线通过凸透镜后会相交于一点，这个点称“焦点”，通过焦点并垂直于光轴的平面，称“焦平面”。焦点有两个，在物方空间的焦点，称“物方焦点”，该处的焦平面，称“物方焦平面”；反之，在像方空间的焦点，称“像方焦点”，该处的焦平面，称“像方焦平面”。光线通过凹透镜后，成正立虚像，而凸透镜则成正立实像。实像可在屏幕上显现出来，而虚像不能。

2.1.1.3　影响成像的关键因素——相差

由于客观条件，任何光学系统都不能生成理论上理想的像，各种相差的存在影响了成像质量。相差主要包括色差、球差、彗差、像散、场曲、畸变。

2.1.1.4　显微镜的成像(几何成像)原理

显微镜之所以能将被检物体进行放大，是通过透镜来实现的。单透镜成像具有相差，严重影响成像质量。因此显微镜的主要光学部件都由透镜组合而成。从透镜的性能可知，只有凸透镜才能起放大作用，而凹透镜不行。显微镜的物镜与目镜虽都由透镜组合而成，但相当于一个凸透镜。为便于了解显微镜的放大原理，简要说明一下凸透镜的 5 种成像

规律：

(1) 当物体位于透镜物方 2 倍焦距以外时，则在像方 2 倍焦距以内、焦点以外形成缩小的倒立实像；

(2) 当物体位于透镜物方 2 倍焦距上时，则在像方 2 倍焦距上形成同样大小的倒立实像；

(3) 当物体位于透镜物方 2 倍焦距以内，焦点以外时，则在像方 2 倍焦距以外形成放大的倒立实像；

(4) 当物体位于透镜物方焦点上时，则像方不能成像；

(5) 当物体位于透镜物方焦点以内时，则像方也无像的形成，而在透镜物方的同侧比物体远的位置形成放大的直立虚像。

显微镜的成像原理就是利用上述(3)和(5)的规律把物体放大的。当物体处在物镜前 F~$2F$(F 为物方焦距)时，则在物镜像方的 2 倍焦距以外形成放大的倒立实像。在显微镜的设计上，将此像落在目镜的 1 倍焦距 $F1$ 之内，使物镜所放大的第一次像(中间像)，又被目镜再一次放大，最终在目镜的物方(中间像的同侧)、人眼的明视距离(250mm)处形成放大的直立(相对中间像而言)虚像。因此，当我们在镜检时，通过目镜(不另加转换棱镜)看到的像与原物体的像方向相反。

2.1.2 显微镜的重要光学技术参数

在镜检时，人们总是希望能获得清晰而明亮的理想图像，这就需要显微镜的各项光学技术参数达到一定的标准，并且要求在使用时必须根据镜检的目的和实际情况来协调各参数的关系。只有这样，才能充分发挥显微镜应有的性能，得到满意的镜检效果。

显微镜的光学技术参数包括数值孔径、分辨率、放大率、焦深、视场宽度、覆盖差、工作距离等。这些参数并不都是越高越好，它们之间是相互联系而又相互制约的，在使用时，应根据镜检的目的和实际情况来协调参数间的关系，但应以保证分辨率为准。

2.1.3 显微镜的光学部件

显微镜的光学部件包括物镜、目镜、聚光镜及照明装置几个部分。各光学部件都直接决定和影响光学性能的优劣，现分述如下。

2.1.3.1 物镜

物镜是显微镜最重要的光学部件，利用光线使被检物体第一次成像，因而直接关系和影响成像的质量和各项光学技术参数，是衡量一台显微镜质量的首要标准。物镜的结构复杂，制作精密，由于对相差的校正，金属的物镜筒内由相隔一定距离并被固定的透镜组组合而成。物镜有许多具体的要求，如合轴、齐焦。齐焦的概念是：在镜检时，当用某一倍率的物镜观察图像清晰后，在转换另一倍率的物镜时，其成像也应基本清晰，

而且像的中心偏离也应该在一定的范围内，也就是合轴程度。齐焦性能的优劣和合轴程度的高低是显微镜质量的重要标志，它与物镜的本身质量和物镜转换器的精度有关。物镜的种类很多，可从不同的角度分类，根据物镜相差校正的程度进行分类，可分为：①消色差物镜(achromatic objective)；②复消色差物镜(apochromatic objective)：复消色差物镜的结构复杂，透镜采用了特种玻璃或萤石等材料制作而成，物镜的外壳上标有“Apo”字样，适用于高级研究镜检和显微照相；③半复消色差物镜(semi-apochromatic objective)：又称氟石物镜，物镜的外壳上标有“FL”字样，适用于镜检和显微照相；④特种物镜：所谓“特种物镜”是在上述物镜的基础上，专门为达到某些特定的观察效果而设计制造的。

2.1.3.2 目镜

目镜的作用是把物镜放大的实像(中间像)再放大一遍，并把物像映入观察者的眼中，实质上目镜就是一个放大镜。已知显微镜的分辨率是由物镜的数值孔径所决定的，而目镜只是起放大作用。因此，对于物镜不能分辨出的结构，目镜放大倍数再大，也仍然不能分辨出。

2.1.3.3 聚光镜

聚光镜又名聚光器，装在载物台的下方。小型的显微镜往往无聚光镜，在使用数值孔径 0.40 以上的物镜时，则必须具有聚光镜。聚光镜不仅可以弥补光量的不足和适当改变从光源射来的光的性质，而且可以将光线聚焦于被检物体上，以得到最好的照明效果。聚光镜的结构有多种，同时根据物镜数值孔径的大小，对聚光镜的要求也相应有所不同。

(1) 阿贝聚光镜(abbe condenser)。由德国光学大师恩斯特·阿贝(Ernst Abbe)设计，它由两片透镜组成，有较好的聚光能力，但是在物镜数值孔径高于 0.60 时，则色差、球差就显示出来。因此，其多用于普通显微镜上。

(2) 消色差聚光镜(achromatic aplanatic condenser)。这种聚光镜又名“消色差消球差聚光镜”和“齐明聚光镜”，它由一系列透镜组成，它对色差球差的校正程度很高，能得到理想的图像，是明场镜检中质量最高的一种聚光镜，因此，在高级研究显微镜中常配有此种聚光镜。

(3) 摇出式聚光镜(swing out condenser)。在使用低倍物镜时(如 4×)，由于视场大，光源所形成的光锥不能充满整个视场，从而造成视场边缘部分黑暗，只有中央部分被照亮。要使视场充满照明，就需将聚光镜的上透镜从光路中摇出。

(4) 其他聚光镜：聚光镜除上述明场使用的类型外，还有特殊用途的聚光镜，如暗视野聚光镜(U-DCD)、相衬聚光镜(U-PCD)、偏光聚光镜(U-POC)和微分干涉聚光镜等，这些聚光镜分别适用于相应的观察方式。

2.1.3.4 显微镜的照明装置

显微镜的照明方法按其照明光束的形成，可分为透射式照明和落射式照明两大类。前者适用于透明或半透明的被检物体，绝大多数生物显微镜属于此类照明法；后者则适

用于非透明的被检物体，光源来自上方，又称反射式照明，主要应用于金相显微镜或荧光镜检法。

2.1.3.5 显微镜的光轴调节

在显微镜的光学系统中，光源、聚光镜、物镜和目镜的光轴以及光阑的中心必须与显微镜的光轴同在一直线上，所以在镜检前必须进行显微镜光轴的调节，否则不能达到最佳观察效果。

(1) 光源灯丝调节：旧式显微镜需要调节灯泡的位置。目前的新型显微镜的光源已经进行了预定心设置，所以不需要调整。

(2) 聚光镜的中心调整：实际上显微镜光轴的调整的重点即是聚光镜的位置调整。首先将视场光阑缩小，用 10×物镜观察，在视场内可见到视场光阑的轮廓，如果不在中央，则利用聚光镜外侧的两个调整螺钉将其调至中央部分，当缓慢地增大视场光阑时，能看到光束向视场周缘均匀展开直至视场光阑的轮廓像完全与视场边缘内接，说明已经合轴，合轴后再使视场光阑略为增大，使轮廓像刚好处于视场外切或略大。

(3) 孔径光阑的调节：孔径光阑安装在聚光镜内，研究用显微镜的聚光镜的外侧边缘上都有刻度及定位记号，这样便于调节聚光镜与物镜的数值孔径相匹配，原则上说更换物镜时需调整聚光镜的数值孔径，一般物镜的数值孔径乘以 0.6 或 0.8 就是聚光镜的数值孔径。

2.1.4 各种显微镜检术介绍

前面讲述了显微镜的光学原理以及部件，下面将分类介绍一下各类研究用镜检术。在生物研究领域，透射式明场显微镜得到了广泛应用，在此基础上各种特殊的镜检方法也得到了应用，如相衬、荧光、干涉、暗场，这些镜检方法在高档显微镜上均能同时实现。

2.1.4.1 正立式显微镜

(1) 明视野(bright field)镜检：明视野镜检是大家比较熟悉的一种镜检方式，广泛应用于病理、检验，用于观察被染色的切片，所有显微镜均能完成此功能。在此不再赘述。

(2) 暗视野(dark field)镜检：暗视野实际是暗场照明。它的特点和明视野不同，不能直接观察到照明的光线，而观察到的是被检物体反射或衍射的光线。因此，视场成为黑暗的背景，而被检物体则呈现明亮的像。暗视野镜检的分辨率远高于明视野镜检，最高达 0.02~0.004μm。

(3) 相衬(phase contrast)镜检术：在光学显微镜的发展过程中，相衬镜检术的成功发明，是近代显微镜技术中的重要成就。我们知道，人眼只能区分光波的波长(颜色)和振幅(亮度)，对于无色透明的生物标本，当光线通过时，波长和振幅变化不大，在明场观察时很难观察到标本。相衬显微镜利用被检物体的光程之差进行镜检，也就是有效利用光的干涉现象，将人眼不可分辨的相位差变为可分辨的振幅差，即使是无色透明的物质

也可清晰可见。这大大方便了活体细胞的观察，因此相衬镜检法广泛应用于倒置显微镜。

(4) 微分干涉相衬(differential interference contrast，DIC)镜检术：微分干涉相衬镜检术出现于20世纪60年代，它不仅能观察无色透明的物体，而且图像可以呈现出浮雕状的立体感，并具有相衬镜检术所不具备的某些优点，观察效果更为逼真。微分干涉相衬镜检时的注意事项：①因微分干涉衬灵敏度高，制片表面不能有污物和灰尘；②具有双折射性的物质，不能达到微分干涉相衬镜检的效果；③倒置显微镜应用微分干涉相衬时，不能用塑料培养皿。

(5) 荧光镜检术：荧光镜检术是用短波长的光线照射用荧光素进行过染色的被检物体，使之受激发后而产生长波长的荧光，然后观察。荧光镜检术广泛应用于生物，医学等领域。荧光镜检术的注意事项：①激发光长时间的照射，会发生荧光的衰减和猝灭现象，因此尽可能缩短观察时间，暂时不观察时，应用挡板遮盖激发光；②油镜观察时，应用“无荧光油”；③荧光几乎都较弱时，应在较暗的室内进行；④电源最好装稳压器，否则电压不稳不仅会降低汞灯的寿命，也会影响镜检的效果。

2.1.4.2 偏光显微镜

偏光显微镜(polarizing microscope)是鉴定物质细微结构光学性质的一种显微镜。凡具有双折射的物质，在偏光显微镜下就能分辨清楚，当然这些物质也可用染色来进行观察，但有些则不可以，而必须利用偏光显微镜。双折射性是晶体的基本特性。因此，偏光显微镜被广泛地应用在矿物、化学等领域，在生物学和植物学中也有应用。

2.1.4.3 倒置显微镜

前面讲的是正立式显微镜的镜检方式，主要用于切片的观察。而倒置显微镜(inverted microscope)是为了适应生物学、医学等领域中的组织培养、细胞离体培养等显微观察。由于上述样品特点的限制，被检物体均放置在培养皿(或培养瓶)中，这样就要求倒置显微镜的物镜和聚光镜的工作距离很长，能直接对培养皿中的被检物体进行显微观察和研究。因此，物镜、聚光镜和光源的位置都颠倒过来，故称为“倒置显微镜”。由于工作距离的限制，倒置显微镜物镜的最大放大率为60×。一般研究用倒置显微镜都配置有4×、10×、20×及40×相差物镜，因为倒置显微镜多用于无色透明的活体观察。如果用户有特殊需要，也可以选配其他附件，用来完成微分干涉、荧光及简易偏光等观察。

2.1.4.4 体视显微镜

体视显微镜(stereo microscope)又称“实体显微镜”或“解剖镜”，是一种具有正像立体感的目视仪器，被广泛地应用于生物学、医学、农林、工业及海洋生物各部门。它具有如下特点：

(1) 双目镜筒中的左右两光束不是平行的，而是具有一定的夹角-体视角(一般为12°~15°)，因此成像具有三维立体感；

(2) 像是直立的，便于操作和解剖，这是由于在目镜下方的棱镜把像倒转过来的缘故；

(3) 虽然放大率不如常规显微镜，但其工作距离很长；

(4) 焦深大，便于观察被检物体的全层；

(5) 视场直径大。

2.1.5 显微摄影技术

2.1.5.1 显微摄影的准备和观察

1) 适合显微摄影的显微镜

(1) 照相目镜筒要能承受住显微摄影装置的重量；

(2) 通过双目镜筒，能对图像进行对焦；

(3) 使用光路选择移动杆(optical path selector)，能将光亮调到适合标本需要的强度；

(4) 物镜要有高分辨率和良好的平场性(整个圆形视场图像都在一个平面上)；

(5) 载物台能够移动；

(6) 聚光镜带有孔径光阑和调节光轴中心的机构；

(7) 显微镜要有视场光阑；

(8) 光源要保证有足够的亮度，可以按照观察和摄影的需要来调节光亮强度。物镜从低倍到高倍变化时，要求光亮度均匀；

(9) 要能够安装滤色镜。

2) 适合显微摄影的显微摄影装置

(1) 显微摄影装置一般有：

a. 手控曝光显微摄影装置：包括专为显微摄影用的不带镜头的镜箱。需要目测或测光表，测出光值后，先推算出正确的曝光时间，再进行手控曝光。

b. 单镜头反光镜箱显微摄影装置：镜箱内有内测光系统，可以自动曝光；

c. 自动曝光显微摄影专用装置：具有自动卷片、自动测光、自动控制曝光以及测量色温和倒易律失效的补偿等功能。

(2) 显微感光记录的方式一般有：

a. 35mm 卷片照相记录；

b. 120 卷片照相记录；

c. 4×5in*，大画面单页片照相记录；

d. 31/4×41/4in、4×5in 等尺寸规格的一步成像(polaroid film)的照相记录；

e. 16mm 的电影摄影记录。

需要注意的是只要有合适的显微镜照相连接器(附有观察、取景装置)，不论是生物显微镜、临床显微镜、倒置显微镜还是体视(解剖)显微镜等，都可以与适合的照相机机身或电影摄影机机身连接起来，进行观察、选视野、照相或拍电影。

(3) 适合显微摄影的显微摄影装置：

a. 要有能够连接显微照相机附件的装置，如35mm照相机后背或大画面底片暗盒；

b. 能按照摄影中需要的不同光亮条件进行光路调节；

c. 能够对标本不同的面积进行测光(对 30%面积的平均测光，或对 1%、0.1%面积

---

* 1 in = 25.4mm。

的点测光)；

d. 能够把照相机附件牢固地固定在显微镜上；

e. 可连接色温测定的装置；

f. ISO/ASA 感光度要有广泛的选择范围；

g. 要有倒易律失效补偿装置，可以进行长时间的自动曝光；

h. 要能够根据标本的具体情况，进行曝光量的调节；

i. 要能够进行手动曝光；

j. 要能装配具有特殊用途的装置，如拍 16mm 电影或 35mm 胶片的定格摄影(在此情况下，还应配有专门的曝光控制装置)；

k. 控制器内要装有自动曝光锁机构。

2.1.5.2 进行显微摄影

1) 工作前的准备

(1) 光路系统的清洁：显微摄影必须保证光路系统的清洁，任何光学部件有了污垢及灰尘，均会影响照片的质量。物镜、目镜及聚光镜等部件，如污垢长期得不到清理，还会引起霉菌的生长，致使不能应用。各部件在擦拭时，只能清理表面，而不应随意拆卸。

(2) 显微摄影时光轴中心的调整是绝对不可忽视的，否则，拍出的图像会出现各部分的感光不匀。关于调整的方法前已述及，这里不予重复。

(3) 其他准备工作：检查镜体与照相系统的安装是否正确；根据被检物体的情况选用适合的感光片；如为半自动和全自动照相系统，需调节好相应的按钮。拍摄前需用观察目镜观察，先调好两眼的瞳距，使两个视场的像合而为一，再调节好两眼的屈光度以适应观察者的视力。

2) 显微摄影的调焦

调焦时必须利用取景侧目镜(聚焦望远镜)或取景目镜，首先进行屈光度的校正，即旋转取景侧目镜或取景目镜上的圆环，使取景框中的双十字线达到最清晰的程度，这时再进行调焦使图像清晰，便可进行曝光。但应指出，应用同一只眼睛调节，不然两眼之间也会存在屈光度的差异。在调节双十字线时，应尽快予以调整，否则长时间的调整，人眼将产生适应性，则不易调得准确，如遇此情况，可双眼远眺前方稍待一段时间后再进行调节。

3) 曝光的补偿

拍摄显微照片时，需要根据被拍摄物体组织结构所占帧幅面积的百分比调节曝光补偿。在明场情况下，如果组织结构的各部分在帧幅内均匀分布，这样不论是平均测光还是点测光，都不需要曝光补偿；若被摄物体所占的面积小或分散，则需要进行曝光补偿，需加长一些曝光时间，否则被摄物体的曝光不够。反之，在暗场情况下，物像是明亮的，在曝光的补偿上就需要减少一些曝光时间。

4) 滤色镜在彩色摄影中的应用

显微彩色摄影常用的滤色镜有以下几种：

(1) 色温转换滤色镜：用于将显微镜照明光源的色温转换成底片所要求的标准。根

据底片的不同要选用相应的滤色镜。

(2) 彩色补偿滤色镜(color compensation，CC)：当拍摄的彩色照片的背景不是白色而有颜色时，可参考表 2.1 选用补偿滤色镜。

表 2.1　校正照片所偏的颜色及相应的需要加用的彩色补偿滤色镜

校正照片所偏的颜色		需要加用的彩色补偿滤色镜	
red	红	青	CCC
green	绿	品红	CCM
blue	蓝	黄	CCY
cyan	青	红	CCR
magenta	品红	绿	CCG
yellow	黄	蓝	CCB

5) 滤色镜在黑白摄影中的应用

黑白感光片没有对色温的要求，一般不需要色温平衡滤色镜和补偿滤色镜。应用最多的为反差滤色镜。常用的是绿色滤色镜，但要得到最有效果的滤色镜，还要根据标本的特点来选择。选用增强标本颜色的滤色镜可参考表 2.2。

表 2.2　标本的颜色与对应的滤色镜的颜色

标本的颜色	滤色镜的颜色
红色/黄色	绿色
黄色/橙色	蓝色
蓝色	橙色

如果要减弱标本的反差，可用与标本颜色相同的滤色镜。例如，蓝色标本组织就用蓝色滤色镜，这可以使蓝色的标本组织反差降低。其他颜色依此类推。

2.1.6　数字显微照相系统

2.1.6.1　数字照相机

随着 PC 机(personal computer)的逐渐普及，用计算机进行图文处理已是日常工作的需要。但计算机只能识别和处理数字文件，对于普通胶片拍摄的照片不能直接处理。在这种情况下，数字照相机应运而生。它与普通胶片照相机有很大的区别，其拍摄的图像可直接生成数字文件，可存储在相应介质上，也可非常方便的传输至计算机或互联网上。如果在计算机内安装上相应的软件，就可以进行人工无法完成的或者非常繁琐的工作，为科研或临床提供更加准确和可靠的数据。

1) 数字照相机的特点

数字照相机的核心部分是 CCD 图像传感器，CCD 内含的晶体管数量越多，像素(pixel)就越多，分辨率也就越高。数字照相机不同于传统的相机，传统的相机是以化学方法将影像记录在卤化银胶片上，而数字照相机则是将影像的模拟信号转换成数字信号存储于

磁介质上，因而可以方便地把数据传输至计算机上。数字照相机具有普通胶片照相机无法比拟的优点，但目前还不能完全替代胶片照相机，将来有可能超过银盐胶片。它们各有优缺点，如表 2.3 所示。

表 2.3　数字照相机和普通银盐胶片照相机的优缺点

项目	数字照相机	普通银盐胶片照相机
优点	数据可以传输到计算机 不需要冲洗胶卷，当时即可得到结果 生成的数字文件可永久保存	高分辨率 高敏感度，可拍摄荧光照片
缺点	分辨率不高 彩色还原不如银盐胶片 对于较暗的标本如荧光，拍摄困难	底片需要冲洗 不能进行图像处理 底片不易保存，时间久了容易损失

2) 数字照相机的性能指标

衡量数字照相机的性能的指标有多种，主要包括 CCD 图像传感器、生成图像分辨率、测光方式、曝光控制、曝光时间、白平衡、显示器、图像记录、输出方式。

3) 数字显微照相系统

只有数字照相机还不能完成前面所述的多种功能，而必须与相应的装置组合成系统才能完成上述功能。一个基本的数字显微照相系统包括以下的几个部分：

(1) 适合显微摄影的显微镜，配以相应适配器，与数字照相机连接。

(2) 高分辨率的显微数字照相机。

(3) 操作简单、方便的控制器。

(4) 数据存储卡。

(5) 计算机传输数据用设备，如直接连接的电缆，或读卡器。

(6) 计算机。

(7) 相应软件系统。

(8) 输出设备，如照片打印机，底片打印等。

在以上内容中，高性能的显微镜提供显微原像是先决条件，高分辨率的数字照相机则是整个系统的核心，而功能完备的软件系统也是关键。

(齐　冬　南　雪)

2.2　电子显微镜

电子显微镜的出现使人类在细胞学、细胞生物学等领域得以认识机体组织、细胞和微小生物体的超微结构，并为阐明其功能起了重要的作用。随着电子显微镜术、细胞化学、免疫学、分子生物学、计算机技术等学科的发展及向细胞学领域的渗透，从观察单纯的细胞超微结构到对细胞及细胞内各种成分的研究，细胞形态学和细胞化学的研究已从定性向定量水平发展，这是细胞生物学领域高科技的必然结果。

2.2.1 透射电子显微镜的结构及基本原理

1931年德国科学家Knoll和Ruska在电子光学的基础上发明了第一台电子显微镜，1938年Ruska研制成功了世界上第一台真正实用的透射电子显微镜(transmission electron microscope，TEM)，1939年德国Siemens-Hulske公司生产出了第一台商品TEM。经过几十年的改进、完善和提高，电镜的放大倍数从开始的12倍提高到现在的100万倍，分辨率从50nm提高到0.1~0.2nm。随着科学技术的发展，高压电镜、高分辨扫描透射电镜和分析电镜等又相继问世了。电子显微镜的发明被誉为20世纪最重要的科学发明之一。

2.2.1.1 透射电镜的结构

透射电镜由电子光学系统、真空系统及电源系统三大部分组成。

(1) 电子光学系统：电镜主体由照明系统(电子枪、聚光镜)、成像和放大系统(样品室、物镜、中间镜、投影镜)和观察记录系统(荧光屏、照相机等)等组成。

(2) 真空系统：由机械泵、油扩散泵及各种管道、阀门等组成。

(3) 电源系统：由高压发生器和灯丝加热电源、透镜稳压电路、计算机控制电路及安全自控电路等组成。

2.2.1.2 透射电镜成像的基本原理

电子显微镜是利用电子枪在高电压(20~200kV)时发射电子束以作为光源透过样品而使物体成像的。电子束实际上是一种阴极射线流或者是带负电的粒子流，它和其他的光线一样既具有波动性也具有粒子性。电子在受到电场或磁场(电子透镜)作用时，会改变前进方向而发生弯曲(折射)并能被聚焦。当电子束照射样品时，大部分的电子都能从原子与原子间的空隙中穿透过去，只有极少的电子会与原子核或轨道电子发生碰撞。当电子与原子核碰撞时，电子基本上不损失能量，只是改变运动的方向，即电子发生了弹性散射(弹性碰撞)。当电子与轨道电子碰撞时，电子不仅会改变原来运动的方向，还会损失一部分能量，即电子发生了“非弹性散射”(非弹性碰撞)。由于样品中不同结构的原子序数不同，散射电子的能力也各不相同，使透过样品的电子束有疏密的差别。散射电子能力强的地方透过去的电子数目少，打在荧光屏上所发出的光就弱，显现为暗区；而散射电子能力弱的地方透过的电子数目多，打在荧光屏上所发出的光就强，显现为亮区。

2.2.2 透射电镜样品制备技术

为了满足透射电镜观察的要求，超薄切片必须做到以下几点：①切片能够耐受电子束的照射，在热和高真空条件下有一定的稳定性。②细胞的超微结构保存良好，尽量减少人工假象。③切片厚度一般在60~80nm为宜。切片太薄可得到较高的分辨率，但反差弱；切片太厚，又会出现结构重叠，分辨率低，甚至会出现电子束不能穿透切片以致无法观察的现象。④要求切片无皱褶、无刀痕、无颤痕和无染色剂污染，并具

有良好的反差。

样品制备的基本程序：取材→前固定→清洗→后固定→清洗→脱水→浸透→包埋→修块→半薄切片→定位 →超薄切片→重金属染色→TEM 观察。

2.2.2.1 取材

从动物组织上剪下2~3mm^{3}大小的样品，迅速投入到戊二醛固定液(4℃)中，固定5min之后，再用新双面刀片将组织切成1mm^{3}小块，然后放入同样的固定液中固定2h。

注意：取材时要求做到：①动作迅速：为了保存酶的活性和防止组织自溶，动物组织应在离体后 1min 内，迅速投入到固定液(4℃)中固定。②部位准确：样品大小为1~1.5mm^3，取样部位一定要准确。③避免人工损伤：取材时动作要轻，要避免机械损伤、牵拉和挤压组织样品。

2.2.2.2 固定

样品的固定使细胞死亡后的变化迅速终止，即尽可能地保存细胞生活状态下的结构和成分。固定方法可分为物理固定和化学固定两大类，其中最常用的固定方法是化学固定法。

1) 常用的固定剂

(1) 戊二醛(glutaraldehyde，$C_5H_8O_2$)：市售戊二醛为 25%或 50%水溶液，淡黄色。能与蛋白质间形成交联，对糖原、糖蛋白有很好的固定作用，但对脂类固定效果差。能保存酶的活性，适合进行细胞化学的工作。

(2) 四氧化锇(osmium tetroxide，OsO_4)：又称锇酸，是一种淡黄色结晶体，易挥发，有毒性，是强氧化剂。能与蛋白质形成交联，起稳定蛋白质的作用。能与不饱和脂肪酸分子发生反应，形成交联复合物，对脂类起到良好的保护作用。对酶活性的保护能力差，不宜进行细胞化学的工作。锇酸分子密度大，能使经它固定的样品的电子反差提高。通常与戊二醛联合使用称为双固定。

a. 常用 1.5%~3% 戊二醛固定液的配制：

戊二醛固定液最终浓度/%	1.0	1.5	2.0	2.5	3.1	4.0
25%戊二醛/ml	1	1	1	1	1	1
0.075mol/L PBS/ml	24	15.66	11.5	9	7	5.25

b. 1% OsO_4 固定液的配制方法：

A 液：2% OsO_4 储藏液

OsO_4	1g
双蒸水	50ml

B 液：1% OsO_4 固定液

A 液	1 份
0.24 mol/L PBS	1 份

2) 固定方法

用2%~3%戊二醛前固定2h，0.075mol/L PBS+0.19mol/L蔗糖缓冲液清洗2次后过夜，1%OsO_4后固定2h，用0.075mol/L PBS清洗10min，以上步骤均在4℃下进行。

3) 缓冲液的配制

缓冲液的目的是把固定液的pH维持在生理值上，以阻止由于渗透压效应而引起的组织收缩或膨胀。常用的缓冲液有磷酸盐缓冲液(PBS)和二甲砷酸钠缓冲液。由于后者具有较强的毒性，除特殊需要外大多数都使用PBS。

(1) 0.075mol/L PBS(pH 7.4)

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.198g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	1.934g
双蒸水	100ml

(2) 0.075mol/L PBS + 0.19mol/L 蔗糖缓冲液(pH 7.4)

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.198g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	1.934g
蔗糖	6.504g
双蒸水	100ml

(3) 0.24mol/L PBS(pH 7.4)：

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.712g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	6.962g
双蒸水	100ml

注意：①样品经戊二醛固定后要彻底清洗，残留的醛可与锇酸起反应而产生电子致密的还原锇，它留在样品内会影响观察。②样品经锇酸固定后也要彻底清洗，以防残余的锇酸固定液和脱水剂形成新的沉淀。③四氧化锇是强氧化剂，有毒性，操作应在通风橱中进行。

2.2.2.3 脱水

使用脱水剂将组织内的水替代出去，以确保包埋介质均匀地渗透到组织内部。最常用的脱水剂为乙醇、丙酮等有机溶剂。

脱水步骤：样品经50%乙醇→70%乙醇→90%乙醇→90%乙醇：90%丙酮(1：1)→90%丙酮→无水丙酮→无水丙酮脱水，脱水时间5~10 min/次，无水丙酮15min/次，除最后一次无水丙酮脱水在室温下进行，其他步骤均在4℃下进行。

注意：高浓度脱水剂会造成脂类被抽提，而低浓度脱水剂又会造成蛋白质类被抽提。因此应根据组织的致密程度和块的大小，适当增加或减少脱水时间。

2.2.2.4 浸透与包埋

(1) 浸透：通过脱水剂稀释包埋剂，最终让包埋剂取代脱水剂，使其完全渗透到组织细胞内。浸透方法：100%丙酮：包埋剂(1：1)浸30min，再用纯包埋剂浸透过夜。致密组织(皮肤、脑组织块)浸透时间可延长到18h左右。

(2) 包埋：将样品置入适当的模具中，灌入包埋剂，经加温逐渐聚合成硬的聚合物。

它将成为细胞结构的支架，并能承受切片时的各种力的作用。

包埋剂：环氧树脂包埋剂常温下为单体，属于甘油多聚酯类，分子中含环氧基和羟基两种反应基团，环氧基与胺类(加速剂)反应，形成首尾相接的长链状聚合物，而硬化剂(固化剂)的酸酐则与羟基结合形成分子间的横桥连接。环氧树脂单体、胺类和酸酐等按一定比例混合，在一定温度条件下，可形成具有三维空间结构的稳定交联状聚合物。常用包埋剂的配制：环氧树脂 Epon812 是一种淡黄色、低黏度，使用最广泛的环氧树脂，它易渗入组织，利于细胞结构的保存。它与硬化剂 DDSA(十二烷基琥珀酸酐)、MNA(甲基内次甲基邻苯二甲酸酐)和加速剂 DMP-30[2，4，6-三(二甲氨基甲基)苯酚]，按一定的比例配制而成，见表 2.4。

表 2.4 Epon 812 包埋剂配方表

配制数量	配方比例(1 : 9)			配方比例(2 : 8)			加速剂
	812	DDSA	MNA	812	DDSA	MNA	DMP-30
1	0.51	0.06	0.43	0.50	0.12	0.38	0.015
2	1.03	0.12	0.85	1.00	0.25	0.75	0.03
3	1.54	0.18	1.28	1.50	0.37	1.13	0.045
4	2.06	0.25	1.69	2.00	0.50	1.50	0.06
5	2.58	0.30	2.12	2.51	0.61	1.88	0.075
6	3.10	0.36	2.54	3.00	0.74	2.26	0.09
7	3.60	0.43	2.97	3.51	0.86	2.63	0.105
8	4.12	0.49	3.39	4.01	0.99	3.00	0.12
9	4.63	0.56	3.81	4.51	1.11	3.38	0.135
10	5.10	0.60	4.30	5.01	1.24	3.75	0.15

注：表中所有数字单位为 ml。

注意：环氧树脂 Epon 812 极易吸潮，配制时要在包埋箱内进行操作。①根据夏季湿度大的特点，适当地调整 DDSA 和 MNA 硬化剂的比例，可调节包埋块的软硬度。夏季用(1 : 9)配方，其他季节用(2 : 8)配方。②可按上述配方表，用干燥、干净的注射器，分别吸取所需液体，顺次加入，再用玻璃棒搅拌均匀。临用前加入 DMP-30 并充分搅匀，注意不要有气泡。

(3) 包埋和聚合方法：将胶囊注满包埋液，用牙签移动样品到胶囊的中心，使组织自然沉落到胶囊的底部。如做定向包埋(如皮肤、消化道、呼吸道等组织)，取材时应将组织切成长方形，包埋时将所要切片的一端对准包埋模具的尖部进行包埋。包埋后样品放入聚合器内，聚合温度及时间为：35℃，12h；45℃，12h；60℃，24h。

2.2.2.5 半薄切片

为了在电镜下最后确定感兴趣的组织的位置，获得在光镜下检查的半薄组织切片是很有必要的。

1) 修块

将包埋块修成与顶面呈 45°斜面的锥体形。顶端是切片面，修成梯形、正方形或长方形。

2) 切半薄切片

用超薄切片机切下 1~2μm 的切片，滴一滴蒸馏水在涂有血清的载物片上，将切片浮在蒸馏水滴上，在 70~80℃电热板上烤干后，再进行苏木素-伊红(HE)染色。

3) HE 染色方法

(1) 切片放在染色盘中，滴 2.5%过碘酸溶液在切片上进行脱锇，50℃，15~20min；

(2) 自来水洗 5min，蒸馏水漂洗 1min，烤干；

(3) 滴苏木素染液于切片上，60~70℃染色 30min；

(4) 自来水洗 5min。如苏木素着色太深，可用 0.25%酸性乙醇分化，1%氨水蓝化；

(5) 滴 1%伊红于切片上，60~70℃染色 10~15min；

(6) 清洗同第(2)步；

(7) 中性树胶封片。

4) 染液配制

(1) 2.5%过碘酸

过碘酸	2.5g
双蒸水	100ml

4℃冰箱保存

(2) Lie 苏木素染液(pH 12.0)

硫酸铝钾	6.0g
苏木素	0.5g
黄色氧化汞	0.25g(缓慢加入)

取 70ml 双蒸水煮沸后依次加入以上试剂搅拌溶解，待其冷却后再加甘油 30ml、冰醋酸 4ml。配好后避光保存，过滤后使用。

(3) 1%伊红(pH 5.5)

伊红	1.0g
95%乙醇	40ml
蒸馏水	60ml

待伊红完全溶解后，加几滴冰醋酸调 pH 至 5.5。

2.2.2.6 超薄切片

1) 载网及支持膜

(1) 载网：超薄切片需放置到铜、镍、金等材料制成的载网上，经染色后才能在电镜下观察。载网的直径为 3mm，孔数有 50、100、200 和 400 目。最常用的是 200 目载网。

(2) 支持膜：在载网上铺覆一层薄膜是为了增加切片对电子轰击的耐受强度。

支持膜的制备方法：支持膜是用 0.4%火棉胶-醋酸戊脂溶液或 0.1%~0.2%聚乙烯醇缩甲醛膜(formvar 膜)氯仿溶液制备而成。先将干净载玻片浸入上述液体中，提出载玻片并使之直立于滤纸上，待干后即在载玻片上形成一层薄膜。用小刀或镊子尖划断膜的四边，将载玻片插入双蒸水中，使薄膜与载玻片剥离而漂浮于水面上。再将洗干净的铜网凸面贴膜，排列于膜上。最后用干净载玻片捞起支持膜及铜网，干燥备用。

2) 超薄切片

(1) 超薄切片机：现市场上有国产及进口的不同牌号的切片机，就其推进原理可分为热膨胀式和机械式两种类型。不同型号的超薄切片机操作方法不同，使用者应按仪器

操作手册进行操作。

(2) 切片刀：切片刀分有玻璃刀和钻石刀两种。大多数是使用一次性的玻璃刀。钻石刀价格昂贵，适合用于硬度高的样品。

(3) 超薄切片厚度：60~70nm。

(4) 捞片：用眉毛针把切片集中，然后用铂金丝圈将它捞出，放置于载网中央。

2.2.2.7 超薄切片的染色

指染色剂(一般为重金属盐)与细胞的某些成分结合或吸附，从而增加其散射电子的能力。不同部位对重金属盐离子的吸附能力不同，吸附重金属能力强的区域，散射电子的能力就强，表现为暗区，反之为亮区。

1) 醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色法

(1) 醋酸铀：又称醋酸双氧铀。能与细胞内大多数成分结合，主要是提高核酸、核蛋白和结缔组织纤维成分的反差，也能对糖原、分泌颗粒和溶酶体染色，但对膜结构染色效果差。

醋酸铀染液：使用棕色试剂瓶配制染液，醋酸双氧铀 2g 加 50%乙醇 100ml，充分搅拌 10min，静置 1~2 天后取其上清液或过滤后取其过滤液。醋酸铀具有一定的放射性及化学毒性，遇光易分解，应密封避光冷保存。

(2) 柠檬酸铅：铅的电子密度很高，对细胞的微细结构有广泛的亲和力，能提高细胞膜系统、脂类和糖原颗粒的反差。柠檬酸铅具有一定的毒性。

柠檬酸铅染色液：

硝酸铅	$Pb(NO_3)_2$	1.33g
柠檬酸钠	$Na(C_6H_5O_2)\cdot 2H_2O$	1.76g
双蒸水		30ml

将上述成分放入 50ml 容量瓶中，用力振荡 30min，至溶液呈乳白色混浊状后，加入 1mol/L NaOH 8ml，使溶液变为清亮透明，再加双蒸水至 50ml，染液 pH12.0，置 4℃冰箱保存。

2) 硅胶板染色法

硅胶板染色器具：小玻璃试管 2 支，同时每根试管各配一个橡皮塞子；硅橡胶板 1 块：用双面刀片在板上划两排共 36 条划缝(图 2.1)。

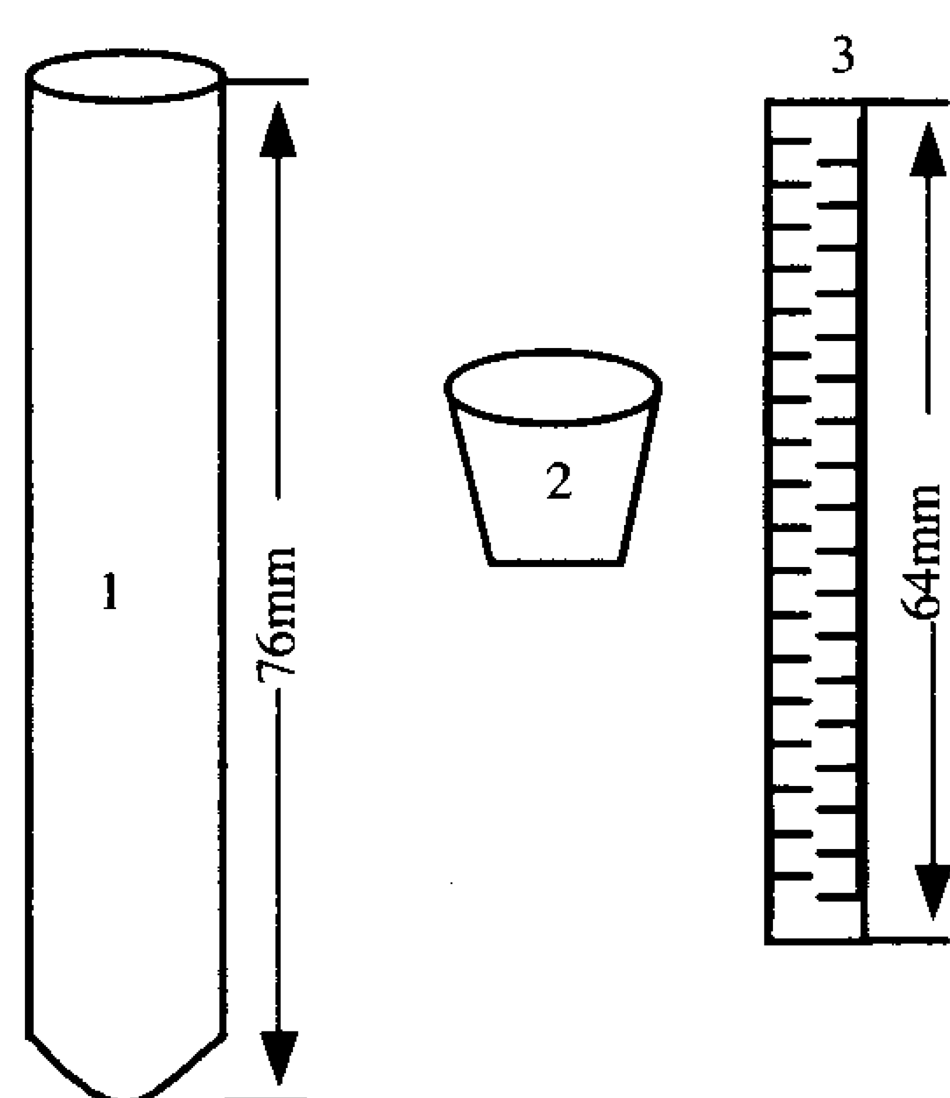


图 2.1 硅胶板染色器具

1. 试管(长 76mm，直径 10mm)；2. 橡皮塞子；3. 硅橡胶板(长 64mm，宽 7mm，厚 3mm，每两条划缝间距 3mm)

染色方法：

(1) 左手持硅橡胶板，用中指从板背面轻轻顶起，使板上的划缝张开，右手用镊子将铜网插入划缝内，直到插完最后一张切片。

(2) 将硅橡胶板插入试管内，加入铀染色液，盖好橡皮塞子，染色 15~20min。

(3) 用镊子将硅橡胶板从试管内取出，用蒸馏水冲洗 20min，再用滤纸将水吸干。

(4) 用同样的方法将硅橡胶板插入到另一根试管内，加入铅染液，盖好橡皮塞子，染色 5~7min，取出板用蒸馏水冲洗 20min，用滤纸将水吸干，自然干燥后即可电镜观察。

注意：①铅染液最好使用 99.99%的高纯度的硝酸铅配制，因为其染色效果好并且不易污染切片。②由于醋酸铀和柠檬酸铅染液具有放射性和毒性，因此操作时要注意防护。

2.2.2.8 特殊样品的制备

1) 血细胞、骨髓细胞

抽静脉血(抽骨髓)3~4ml，放入含有肝素抗凝剂的离心管内摇匀，以 800~1000r/min 的速度离心 8~10min，血液可分为血浆(上层)、白细胞(白色中层)和红细胞(红色下层)三层。用吸管沿管壁轻轻地将血浆吸掉，露出白细胞层，沿壁缓慢加入 2.5%的戊二醛，4 ℃固定 1h。取出透明层，切成 1mm×1mm×2mm 长方块，再用戊二醛固定 1h。其他步骤按常规样品制备。

2) 培养细胞样品

由于培养细胞小、数量少以及培养方式的多样化，使得完全按照同一个方法制备样品已不能满足培养细胞电镜观察的要求。应根据观察目的选择合适的细胞培养方式，再采用不同的制样方法。

(1) 根据观察目的的不同，归纳了 4 种不同的细胞培养方式：①观察细胞一般形态的超微结构，细胞应在培养瓶(玻璃或塑料)或培养皿(玻璃或塑料)内培养，细胞呈贴壁式或悬浮式生长；②观察细胞和细胞间的连接结构，细胞应在载玻片、可拆卸的 96 孔培养板中或滤膜(millipore 0.45μm pore)上培养；③观察原位特定细胞(如观察某个培养细胞的分裂像)，细胞应在 35mm 塑料培养皿中或 6 孔培养板内培养；④观察组织工程中培养在胶原内的新生细胞。

(2) 根据不同的细胞培养方式，选择不同的样品制备方法。

a. 培养瓶内细胞的样品制备方法：游离的培养细胞以 800~1000r/min 的转速离心 10min，细胞沉在离心管底部，用吸管吸去培养液，加入戊二醛固定液 4℃固定 1.5h。其他步骤按常规制样方法进行。贴壁细胞：用硅胶刮将细胞刮下来，切忌使用刀片刮，离心后按上述方法制备。

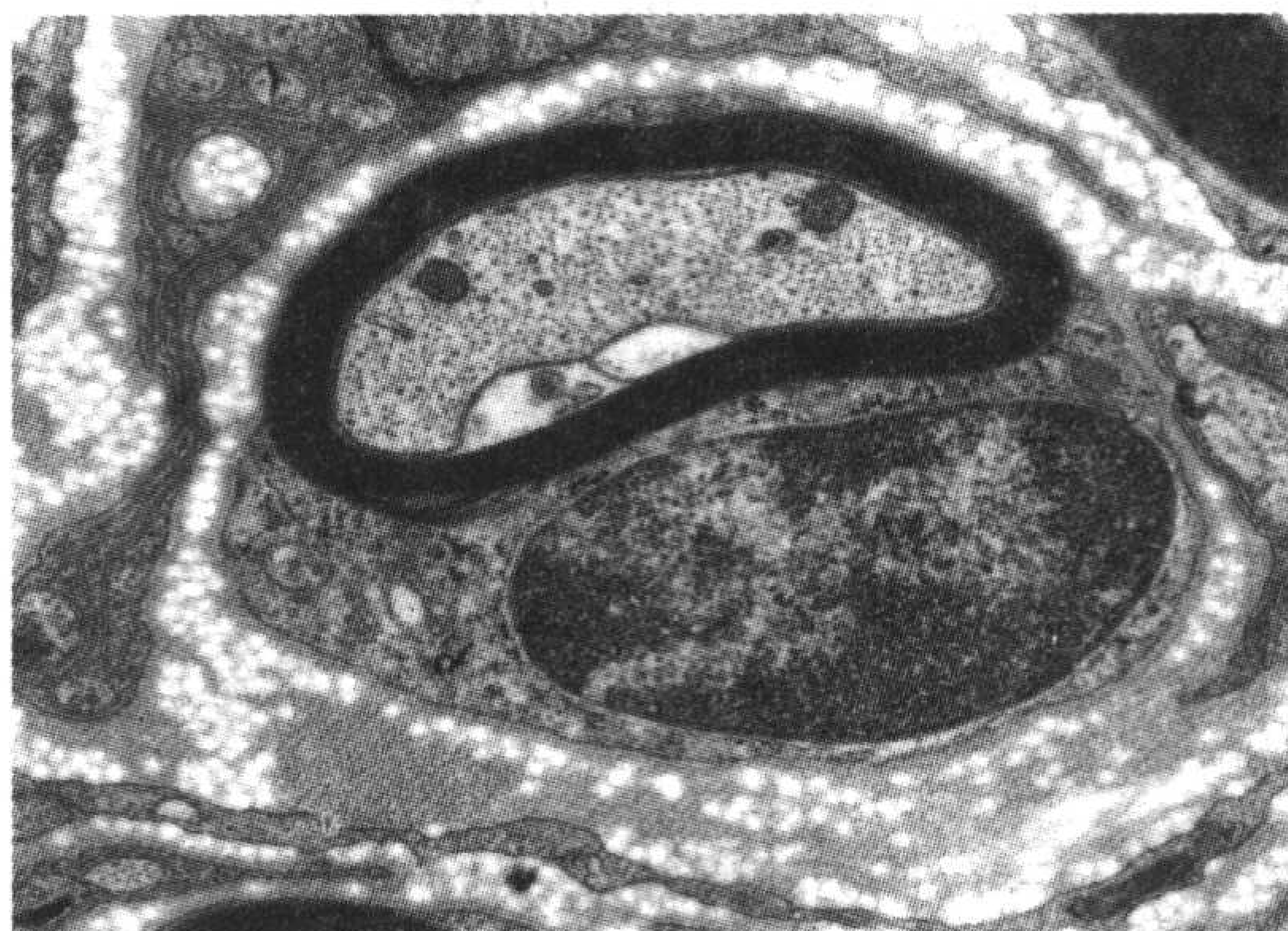


图 2.2　大鼠脊髓少突胶质细胞(1700×)

b. 原位包埋法：①细胞长在载玻片上：将细胞连同载玻片一起固定、脱水和浸透。细胞面朝上与液体直接接触。在光镜下先选好要观察的细胞区域然后再包埋。②细胞在可拆卸的

96孔板内培养：样品制备在板内进行，固定、脱水、浸透和包埋均按上述方法操作，聚合后用锤子砸碎塑料外壳，取出样品块，修块后可直接切片。③原位特定细胞培养在35mm塑料培养皿或6孔板中：同②制备方法一样，在培养皿内进行固定、脱水、浸透、包埋和聚合，在光镜下定位观察细胞，经修块后再切超薄切片。④细胞长在滤膜或胶原上：将滤膜或胶原视为一个组织块，按上述制备方法进行固定、脱水和浸透，最后用定向平板包埋板包埋(图2.2)。

2.2.3 扫描电子显微镜的结构和原理

1935年Knoll首先提出了扫描电子显微镜(scanning electron microscope，SEM)的设想，直到1965年英国剑桥大学才生产出第一批商品SEM，其分辨率从最初的50nm提高到现在的0.7~1nm，放大倍数从1万倍提高到20万倍。20世纪80年代又出现了扫描隧道显微镜、原子力显微镜和环境扫描电镜等电子显微镜。

2.2.3.1 扫描电镜的结构

扫描电镜的主要结构是由电子光学系统，电子信号的收集、检测、显示系统和真空系统等组成。

(1) 电子光学系统：由电子枪、扫描装置、系列电磁透镜和样品室等组成。

(2) 信号检测与转换系统：包括二次电子检测器、背散射电子检测器和探头等。

(3) 信号的显示与记录系统：包括显像管、照相机和计算机记录装置等。

(4) 真空系统：机械泵和扩散泵。

2.2.3.2 扫描电镜二次电子成像的基本原理

电子枪发射出的电子束，经聚光镜和物镜组成的电子光学系统聚焦到样品表面上，按顺序逐行地对样品表面进行扫描，然后由检测器收集样品表面发射出来的二次电子并转变为电流信号，再经视频放大形成图像信号，最后由显像器显示图像。

2.2.4 扫描电镜样品制备方法

2.2.4.1 取材

取材的要求基本与透射电镜相同，但观察样品面积可大些[(1~1.5)mm×(3~5)mm]。

2.2.4.2 清洗

组织表面如覆盖有黏液、分泌物(如气管、肠等)或有一些杂物(如胃表面除有分泌物外还有未消化的食物等)的样品，需经过充分清洗后方可固定，否则将会影响电镜观察。

清洗方法：对表面覆盖有杂物的组织，可以先用生理盐水或PBS将杂物冲洗掉，再用蒸馏水漂洗两次。对表面有蛋白黏液分泌物的样品，可先用蛋白水解酶作用使之变成易溶于水的颗粒，再用蒸馏水漂洗。

2.2.4.3 固定、脱水

与透射电镜样品制备基本相同。

注意：为了减少细胞表面结构的收缩，脱水应从低浓度的 30%乙醇开始，经 50%→70%→80%→85%→90%→95%乙醇，最后到 100%乙醇递增脱水。除 100%乙醇 15min/次外，其他脱水均为 10min/次。

2.2.4.4 样品的干燥

样品的干燥处理是扫描电镜制样技术的关键，干燥方法有真空干燥法、冷冻干燥法、临界点干燥法和化学干燥法。以前临界点干燥法应用最多，其操作简单，干燥效果也较好，但需要专门的仪器。近几年化学干燥方法应用更为广泛。

1) 临界点干燥法

物质都是以固体、液体和气体三种状态存在的，在一定的温度和压力下，三种状态可以相互转变。液体 CO_2 在温度 31.5℃，压力 72.8kg/cm^2(1kg/cm^2 ≈ 0.1MPa)时界面消失，样品中的水分在 CO_2 液体气化的临界状态环境中得到干燥。

操作步骤：样品脱水后经醋酸异戊酯置换，放入 CO_2 干燥仪样品室，注入液体 CO_2 至样品室 70%的容量并加温至 35℃，此时压力达到 110 个大气压，CO_2 气液界面消失，维持一定时间后放出 CO_2 气体。

2) 化学干燥方法

使用有机溶剂六甲基二硅胺烷(hexamethyl disilazane，HMDS)，使有机物质中的非活性氢发生酸化反应，提高有机物质的挥发性、溶解性和反应性，迅速除去样品中的水分和前期处理过程中存留于组织中的有机溶剂而使样品干燥。该法不需要任何仪器设备，没有中间环节对样品的影响，具有操作简单、费用低、用时少和干燥效果好的优点。

样品制备方法：样品经 100%乙醇脱水后，进入到 HMDS(I)和(II)15min/次，最后样品在空气中自然干燥。样品如能放置在真空干燥箱内低真空干燥效果会更好。HMDS 有毒，操作时应注意防护，样品自然干燥要在通风橱内进行。

2.2.4.5 样品的导电处理

生物样品大多为不导电或导电不良体，SEM 观察时易产生“滞电现象”而“打火”，从而影响对微细结构的观察。在观察前需要对样品进行导电处理，这样处理后的样品既能增强了其导电性能，又能增加样品发出二次电子的数量，以达到提高电镜图像质量的目的。导电处理最常用的是离子镀膜法，又称离子溅射。在离子镀膜装置中，将样品放于正极，金、铂等金属放在阴极，在 10^{-1}~10^{-2} Torr(1Torr = 1.333 22×10^{2}Pa)的状态下，增加电压(100~3000V)，使残留的气体电离形成“辉光放电”，金属原子受离子的轰击而逸出，并与气体离子反复碰撞，从各个方向进入形貌复杂的样品缝隙和凹陷处，最后在样品表面均匀地覆盖一层金属膜。

2.2.4.6 特殊样品的制备

(1) 血细胞：先在 1cm×0.5cm 的盖玻片上涂一层 1%的 Formvar 膜或血清，待干燥后，

将一滴血滴到盖玻片上，再用吸管轻轻地将血滴拨平。加入 2%~2.5%戊二醛固定液固定 1h，0.075mol/L PBS 清洗 2 次，10min/次，1% OsO_4 固定 30min，蒸馏水洗 10min。之后步骤同常规样品制备。

(2) 培养细胞：先将细胞在 1cm×1cm 大小的盖玻片上培养，停止培养后，用 0.075mol/L PBS 漂洗，加入 2%~2.5%戊二醛固定液固定 1h。之后步骤同常规样品制备(图 2.3)。

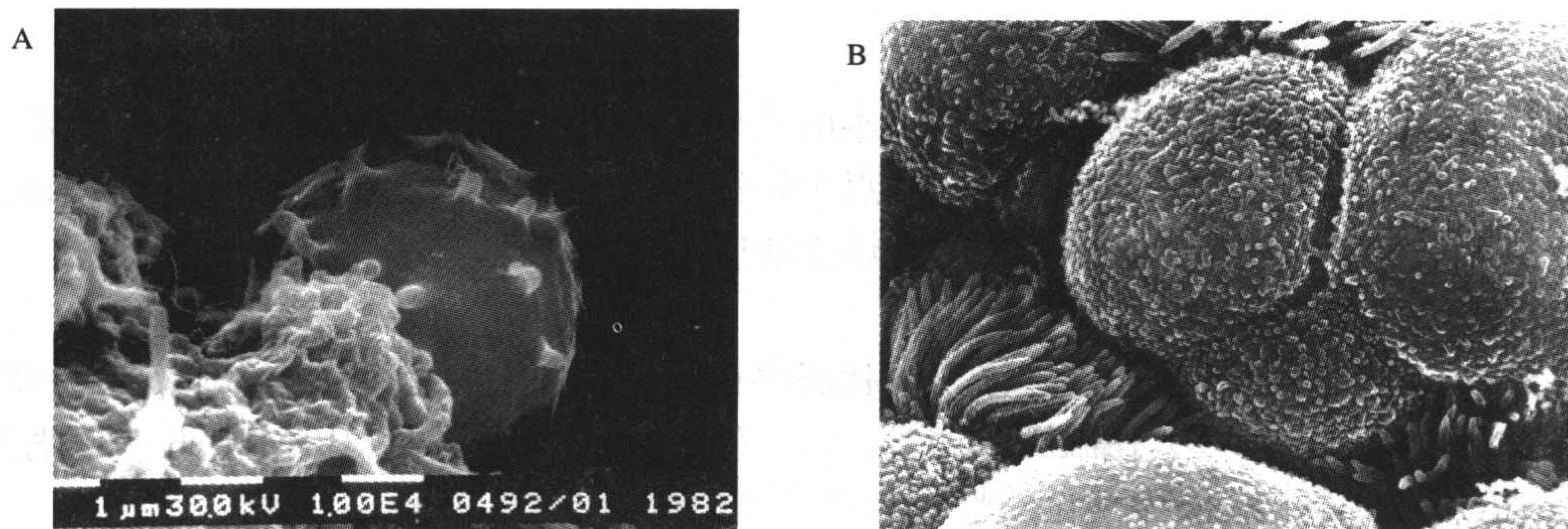


图 2.3 SEM 照片

A. 人外周血淋巴细胞；B. 小鼠气管黏液上皮细胞、黏液细胞和纤毛细胞

2.2.5 免疫电镜胶体金标记技术

免疫电镜技术是利用抗原抗体特异性结合的原理，在细胞超微结构水平上定位、定性和定量，原位显示抗原大分子的技术。1971 年 Faulk 等将胶体金标记抗体技术应用到电镜中，开始了免疫电镜胶体金标记技术。该技术的优点是：胶体金颗粒致密，易于辨认；定位比酶标记反应物更精确，同时还可以做定量分析；由于金颗粒直径的不同(适合电镜的金颗粒直径为 5~10nm)，可以在同一切片上分别标记不同的抗体以做双标记或多标记。免疫电镜胶体金标记技术还可以用到冷冻超薄切片、冷冻置换、冷冻蚀刻和扫描电镜样品制备中。

免疫电镜胶体金标记法可以分成包埋前标记法和包埋后标记法。前者由于金颗粒较大，对细胞膜的穿透性差，一般只用于细胞表面的抗原表面标记。如果要做细胞内细胞器的定位标记，可以用 Triton X-100 等活性剂给细胞膜打洞，但是活性剂会破坏细胞的超微结构。目前国外已成功制备了 1nm 金标记的探针，该探针可以穿透组织和细胞，这样就可以标记细胞内抗原。后者主要是进行细胞器的定位标记。包埋前标记法，即样品先与一抗和二抗相结合以标记细胞表面抗原，然后再按常规超薄切片技术制备样品。包埋后标记法的操作程序则与其相反，先按常规超薄切片术进行生物制样，然后再标记细胞内各种细胞器上的抗原。

包埋后免疫胶体金标记步骤：

(1) 将 70nm 超薄切片收集到 300 目附有 Formvar 支持膜的镍网上。

(2) 准备一个培养皿，内放一张 Parafilm 薄膜。滴一滴 8%高碘酸溶液在 Parafilm 薄膜上，然后将带有切片的镍网轻轻浮在液面上(有切片的一面向下)10~20min，以达到去

锇酸和增进树脂穿透性的目的。

(3) 用 0.01mol/L PBS(pH7.4)清洗 3 次，5min/次，用滤纸吸掉多余的液体。

(4) 将镍网浮于 0.5% BSA(pH7.4)液滴上 20min，以便和固定剂中的游离醛基结合，阻断和一抗的非特异性结合。

(5) 切片在适当稀释的一抗中孵育，4℃、24~36h。

(6) 漂洗同步骤(3)。

(7) 适当稀释胶体金标探针(可以是二抗-胶体金、蛋白 A-胶体金等)，室温下孵育 40~60min。

(8) 漂洗同步骤(6)。

(9) 蒸馏水漂洗 3 次，5min/次。

(10) 常规醋酸铀、柠檬酸铅染色。

(11) 电镜下观察。

注意：①所有标记步骤均是在潮湿的培养皿中进行。除上面第(5)步是在 4℃ 下进行，其他步骤均在室温下进行。②漂洗后用滤纸吸掉多余的液体，但是不能让切片干燥。③一抗和二抗的稀释浓度需根据不同的样品来决定，免疫电镜胶体金标记抗体的浓度可以参考光镜胶体金标记抗体浓度。

(杨　怡)

2.3 共聚焦显微镜

激光共聚焦显微镜是光学显微镜的重大改进，其改进主要表现为可以观察活细胞、固定细胞和组织的深层结构，并且可以得到清晰的多层 z 平面结构，即光学切片，并可以此构建标本的三维实体结构。随着计算机系统、存储系统、激光系统、检测器、干涉镀膜技术、荧光染料的不断改进及最新光谱系统和同步刺激系统的引入，共聚焦显微镜系统也在不断地扩展其应用领域。

2.3.1 共聚焦显微镜简介

共聚焦显微镜与传统场式(widefield)照明显微镜相比有许多特别的优点，包括：可以控制焦深、照明强度，降低非焦平面光线噪声干扰，从一定厚度标本中获取光学切片，即显微 CT。共聚焦最核心的技术是通过空间过滤技术去除了一定厚度标本的非焦平面信息，因为对于普通场式光源显微镜来说，标本非焦平面信息的干扰是不可避免的。而共聚焦显微镜近来在科研领域的迅速发展，主要原因是因为其可以在不改变普通荧光显微镜的制片方法的前提下，可以观察到非常清晰的高质量图像，并且通过共聚焦显微镜可以十分方便的观察活的细胞或组织。事实上，共聚焦技术已经成为光学显微镜的一个最重要的技术进步。

在传统的场光源反射式荧光显微镜中，当处于焦平面的标本被激发时，通常伴随着次级荧光的干扰，从而使图像清晰度下降。当标本厚度大于 2μm 时，该现象就变得十分

明显，利用场式照明通常会掩盖标本本身的细节。共聚焦显微镜不仅能提高轴向的清晰度(*z* 轴)和侧向分辨率(*x* 和 *y* 方向)，而且可以屏蔽次级荧光。虽然共聚焦显微镜从某种程度上增加了分辨率，但还是低于透射电子显微镜的分辨率。从这个角度来讲，共聚焦显微镜是介于上述两种传统显微镜之间的观察方法。

2.3.2 共聚焦显微镜的基本原理

图 2.4 展示了反射式荧光激光扫描显微镜的结构图。激光系统光源发射的相干光相继通过位于共轭平面(confocal)的针孔光阑(pinhole aperture)，该针孔与标本上的扫描点及位于光电倍增管(photomultiplier tube，PMT)检测器前的第二个共焦针孔共轭。激光被分光镜反射后在标本上的特定焦平面内扫描，从该焦平面上点发射的激发荧光返回并穿过分光镜后在检测小孔光阑处被会聚为共聚焦点。

绝大部分物镜焦平面上面或下面点发射的荧光不能会聚到小孔，所以离焦荧光只有一小部分能够通过小孔，大多数的离焦光线不能被光电倍增管检测，因此不会影响最终图像质量。分光镜、吸收滤光镜和激发滤光镜在此系统中执行着与在传统场式反射荧光显微镜中同样的功能。在共聚焦显微镜中改变物镜焦平面就是将激光激发点和荧光发射点转移到新的焦平面，新的焦平面同样与光源和检测器的小孔光阑共轭。

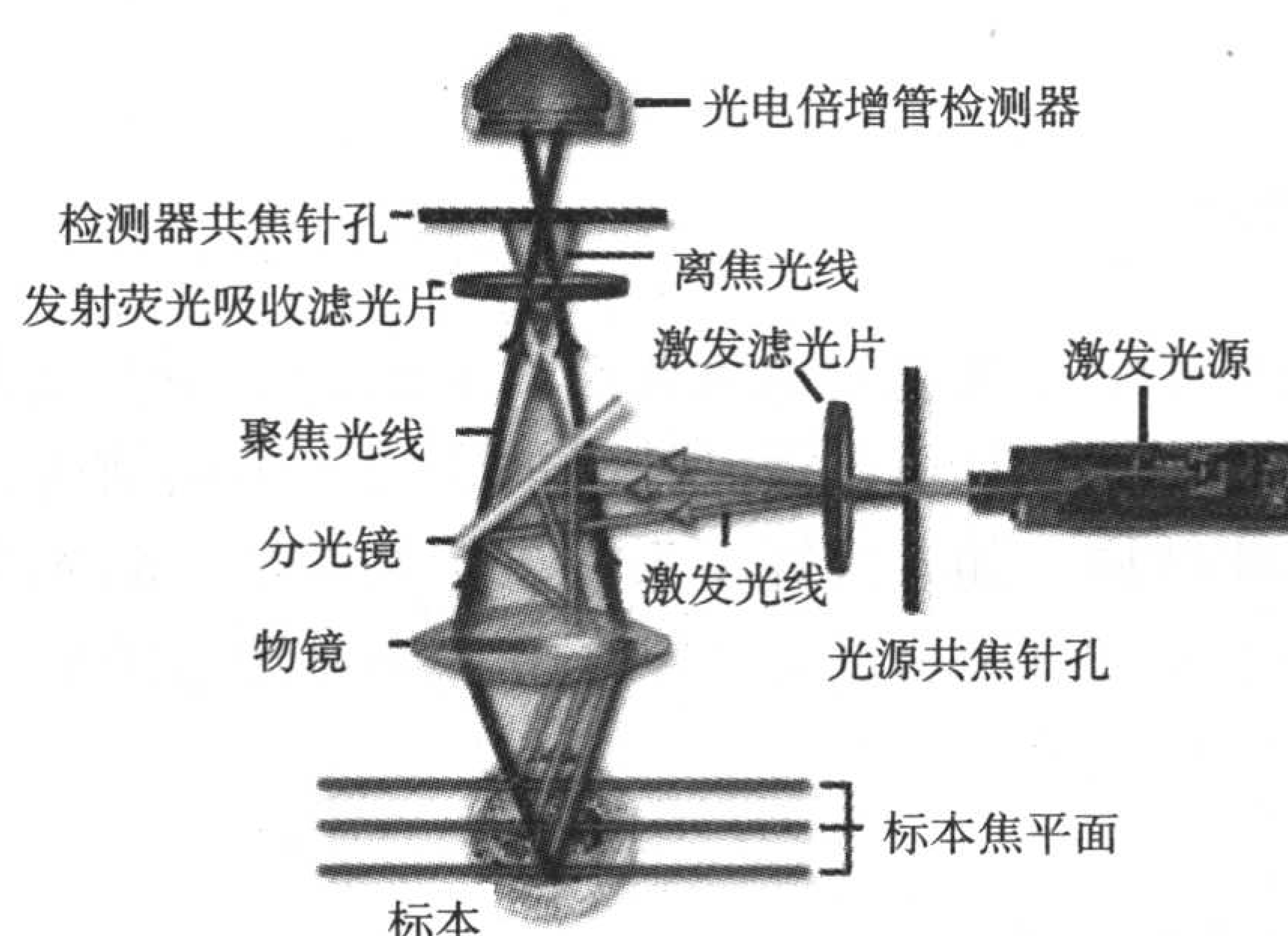


图 2.4　反射式荧光激光扫描显微镜的结构图

扫描单元在共聚焦系统中扮演着心脏的角色，担负着编排激发光线扫描并同时获取标本发射光子的任务，并组合成最终图像。扫描单元一般包括：外部激光输入口、XY 扫描振镜、共聚焦针孔和 PMT 检测器。

扫描单元中最重要的元件是共焦针孔(pinhole aperture)，它在 PMT 前面图像焦平面的共轭面处构成空间滤镜。通常不同规格的针孔被安装在一个转盘上，使用者可以通过旋转转盘而调节共焦针孔的大小(即调节光学切片的厚度)。物镜采集的次级荧光经过同一对 XY 扫描振镜后通过吸收滤光镜到达共焦针孔。共焦针孔可阻挡掉位于焦平面上或下方的非焦平面信号，即滤除掉投射到针孔平面上的直径较大的艾里斑，所以只有很少一部分的非焦平面信息可以通过针孔到达 PMT。共焦针孔同样可以滤除掉光路

中的散射光线。点扫描结合共轭面共焦针孔的空间滤镜构成了共聚焦显微镜的最显著特点。

当比较传统场式显微镜和共聚焦显微镜的异同点时，我们通常要比较二者标本照明系统的特征和几何光学。传统场式落射照明显微镜中，光束通过物镜会聚在标本上形成一个体积较大的锥体结构，该照明比较均一。大部分的发射荧光直接通过物镜(接收量取决于物镜的数值孔径)透射到目镜或检测器。而大量的来自于标本焦平面上或下的背景荧光和自发荧光会被同时采集，结果大大降低了图像的分辨率和对比度。

共聚焦显微镜采用激光光源，经过扩充后充满整个物镜后焦平面，然后经过物镜的透镜系统，在标本的焦平面上会聚成非常小的点。根据物镜数值孔径不同，最亮的照明点直径大小约为 0.25~0.8μm，深度约为 0.5~1.5μm。共聚焦点的大小决定于显微镜设计、激光波长、物镜特性、扫描单元状态设定和标本性质。场式显微镜的照明范围和照明深度都很大，而共聚焦显微镜的照明则集中到焦平面上的一个精确的焦点上。

激光扫描共聚焦显微镜中，通过检流器电动机(galvanometer motor)驱动两个高速振荡的反光镜在一个精确的平面内扫描会聚光束，进而产生共聚焦图像。其中一个振镜沿着 x 轴方向从左到右移动光束，而另一个振镜则沿着 y 轴方向振动。当每条光线扫描过标本焦平面时，标本发射的荧光被物镜采集并返回到共聚焦光学系统。与光速相比，扫描振镜的振动速度可以忽略不计，所以可以认为受激发射的荧光沿着与其激发激光相同的光路传递。通过扫描振镜后，标本荧光直接通过多色分光镜并聚焦到共焦针孔。与会聚的激发光线在标本上扫描不同，标本焦平面发射的荧光始终稳定的通过共焦针孔上的同一位置。

通过共焦针孔的荧光被光电倍增管(PMT)转换为与灰度正相关的连续电压，形成模拟电信号。对该模拟电信号进行周期性取样，并通过扫描单元中的模数(A/D)转换器转换为像素。该图像信息被临时存储在计算机的显卡中并显示在显示器上。必须注意，标本的共聚焦图像是一种重建的图像，是从 PMT 采集的荧光光子信号到电子装置之间的点到点的成像系统，而不是从显微镜目镜直接观察到的实际图像。

2.3.3 共聚焦显微镜的优势和弱点

共聚焦显微镜最基本的优点是可以对厚荧光标本(可以达到 50μm 或以上)进行精细的光学切片，切片的厚度约为 0.5~1.5μm。系列光学切片图像可以通过精确的显微镜 z 轴步进马达上下移动标本而获得。图像信息的采集被控制在精确的平面内，而不会被位于标本上其他位置发出的信号所干扰。在去除背景荧光影响和增加信噪比后，共聚焦图像的对比度和分辨率比传统场式照明荧光图像有明显的提高。共聚焦显微镜的优势使得我们可以观察活细胞、组织的三维结构，并从中获取时间或多荧光通道的图像信息。对每一组三维图像进行重建后，我们就可以看到三维立体多色图像随时间的变化情况。通过共聚焦我们既可以记录长时间的延时实验图像，又可以记录小幅图像在不同时刻的快速变化。随着激光系统的不断改进以使对活细胞的伤害减低和计算机处理、存储能力的不断增加从而可以快速的处理图像结构，多维共聚焦显微镜技术越来越多的被应用到活

体研究中，成为细胞生物学研究的有力工具。

共聚焦显微镜与传统场式显微镜不同，它可以同时获取和显示多标记荧光。而且共聚焦显微镜可以通过扫描单元内的滤光片转轮，采用不同程度的带通滤光片，尽量减少多色荧光之间的波段叠加(cross talk)，同时在激发过程中可以采取顺序扫描(sequential)的方式，即在采集不同染料荧光时依次使用不同激发光激发，这样又避免了激发光对不同荧光染料的交叉激发。

共聚焦显微镜还可以在不改变物镜的情况下对标本进行放大扫描，该特点被称为放大因子(zoom factor)，该方法通常用来调节图像的空间分辨率，同时标本的空间分辨率和放大率都增大了。共聚焦放大后的图像与用高放大率、低数值孔径物镜直接获取的无放大图像效果一样，即只要数值孔径足够，共聚焦就可以获得物镜的最佳分辨率。

共聚焦显微镜的缺点主要有三个：①常用激光激发谱线(laser line)较少，激光谱线非常狭窄而且紫外区的激光器往往非常昂贵，而常规场式照明可使用汞灯或氙灯提供紫外、可见光到近红外全波段激发波段。②激光照射的辐射强度过高，对活细胞或组织的杀伤严重。③激光共聚焦的价格远远高于传统显微镜，往往普通实验室难以独立购买，需要多个实验室的经费共同购买或由中心实验室购买。

2.3.4 共聚焦显微镜的扫描方式及应用

(1) XY 扫描：获取更清晰的单层面、多通道的细节结构，应用于多种荧光定位即共定位研究等。

(2) XYZ 扫描：获取图像三维信息，应用于标本的空间实际位置的信息研究。

(3) XYt 扫描：获取图像的时间信息，研究活体标本随时间的变化，或在不同时间采取不同的处理方法观察标本的荧光变化。如 FRAP、FRET、光活化、膜流动性、游离钙测定、pH 测定等。

(4) Xt /Yt /自由曲线/点扫描：扫描线/点上荧光信号随时间的变化情况，由于线扫的信号采样率为毫秒级，远远大于 XY 图像的获取速度，所以线扫经常用于记录神经信号，如钙火花(20ms 左右)等。

(5) XY-λ扫描：扫描 XY 平面图像在整个波段内的荧光强度变化。通过该方法可以查看标本荧光光谱，可以确定最佳荧光谱段，并且通过该方法可以拆分发射峰值极为接近的染料或从较强背景荧光中提取染料荧光。

(6) 除上述扫描方式外，还有将多种扫描方式结合在一起的扫描，如 XYZt/XYZtλ 等。多数共聚焦还可以进行放大、局部和旋转等模式的扫描，另外通过程序性扫描还可以将各种方式集合到一起，在不同时间段进行各种模式的自动扫描。

(7) 此外，双扫描系统为生物学研究又增添了新的手段。该系统除 XY 扫描振镜外，另外引入一个扫描头，新的扫描头与 XY 振镜各自独立工作，只进行光刺激功能。这样就解决了以往用 AOTF 或 ZOOM 方式进行光刺激工作时必须在取图和刺激间频繁切换的问题，提高了刺激效率，节省了操作时间。其最大的优点是可以在刺激标本的同时不影响正常的图像获取，即可以在刺激的同时看到标本的瞬间变化，为

FLIP/FREP/Keade 蛋白/PA-GFP 蛋白/解笼锁(uncage)等光刺激研究提供了最佳的解决方案。

2.3.5 共聚焦显微镜的操作方法

各个厂家的共聚焦显微镜都有各自不同的操作方法，请参照各厂家提供的说明书操作。这里只简单介绍基本的操作手段。

(1) 打开各种电源和实验所需激光器，打开电脑，进入操作界面。

(2) 选择合适物镜，通过选择染料(见附录 2)或共聚焦光路的方法，选择染料对应的共聚焦光路。

(3) 先用透射光找到标本平面，然后用汞灯为光源选择适合染料的显微镜激发块，在镜下找到适宜的荧光标本。

(4) 通过“自动对比度”扫描方法自动扫描(如果共聚焦没有该扫描方法，请进行下一步)。

(5) 用聚焦扫描模式，调节各荧光通道的 PMT 电压(HV)、增益(gain)和背景补偿(offset)或 pinhole(注意共聚焦 pinhole 的调节要慎重，因为 pinhole 大小不同会影响图像的 z 轴光学切片厚度)，使图像亮度和对比度适宜观察。

(6) 移动载物台或用 ZOOM 等方法选择合适的标本位置和标本大小。

(7) 选择扫描模式，如 XY、XYZ、Line-t 等，进行扫描获取图像[不同共聚焦可以通过增加改变光谱条件、改变扫描速度、采取序列扫描(sequential)或增加卡尔曼(Kalman)滤镜等步骤而改变图像质量]。

(8) 分析图像。

(齐　冬　南　雪)

2.4 流式细胞术鉴定特异基因的表达

干细胞可以不断地自我更新、繁殖产生更多的干细胞，同时也可以分化成各种各样的祖细胞，后者又可进一步成熟发展成多种其有特定功能的细胞系。干细胞的这种功能特性极大地吸引了来自基础医学和临床医学的研究者。然而干细胞仅仅是通过其具有的功能所定义的，而没有形态学和表型上存在的证据，所以鉴定这类独特的细胞群是一项非常具有挑战性的工作。目前大多数鉴定干细胞的工作都是在体外模拟环境中进行的。除了体外培养细胞以观察其是否具有分化潜能和利用分子生物学方法检测特异基因的表达外，对干细胞的鉴定主要是建立在对细胞表面标记物的识别基础上，通过这些分子标志物可给不同的干细胞群体定性。尽管这些早期标志物的作用还有待确定，但不同来源的干细胞所具有的特异性的表面标志为干细胞鉴定提供了有利的证据。采用流式细胞仪特有的细胞分析技术，可在短时间内精确分析出细胞表型以及其所占有的比例，为干细胞鉴定提供了可靠的科学数据。

2.4.1 流式细胞仪检测分析原理

当细胞携带有荧光素标记物，通过激光照射区时，受激光激发，可产生代表细胞表面或细胞内不同物质、不同波长的荧光信号，这些信号以细胞为中心，向空间 360°立体角发射，产生散射光和荧光信号。散射光分为前向角散射(forward scatter，FSC)和侧向角散射(side scatter，SSC)，由于它不依赖于任何细胞样品的制备技术(如染色)，因此被称为细胞的物理参数(或称固有参数)。前向角散射与被测细胞的相对表面积密切相关，通常在 FCM 应用中，选取 FSC 作阈值来排除样品中的各种碎片及鞘液中的小颗粒，以避免对被测细胞的干扰；侧向角散射是指与激光束正交 90°方向的散射光信号，其对细胞膜、胞质、核膜的折射率更为敏感，可提供细胞内精细结构和颗粒性质的相关信息。上述两种信号都是来自于激光原光束，其波长与激光相同，目前采用这两个参数组合，可区分经裂解红细胞处理后外周血白细胞中淋巴细胞、单核细胞和粒细胞这三个细胞群体，或在未进行裂解红细胞处理的全血样品中找出血小板和红细胞等细胞群体。当激光光束与细胞正交时，一般会产生两种荧光信号，一种是细胞自身在激光照射下发出微弱的荧光信号，称为细胞自发荧光；另一种是经过特异荧光素标记细胞后，受激发照射得到的荧光信号，通过对这类荧光信号的检测和定量分析就能了解所研究细胞的参数的存在与定量。荧光染料可选用的荧光素有多种，由于它们分子结构不同，其荧光激发谱与发射谱也各异。选择染料或单抗所标记的荧光素必须考虑仪器所配置光源的波长，目前台式机 FCM 常配置的激光器为 488nm 及 633nm，通常可用染料有碘化丙锭(propidium iodide，PI)、藻红素(phycoreythrin，PE)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate，FITC)、peridinin chlorophyll protein(PerCP)、PE-Cy5、APC、APC-Cy7 等。

目前 FCM 数据的存储的方式均采用列表排队(list mode)方式。数据显示方式包括单参数直方图(distribution histogram)、二维点图(dot plot)、二维等高图(contour plot)、二维密度图(density plot)，假三维图(pseudo 3D)和三维图。直方图是一维变量图形显示形式，横坐标表示荧光信号或散射光信号的相对强度的值，其单位是道数，横坐标可以是线性的，也可以是对数的；纵坐标一般是细胞数。二维点图、等高图、密度图及假三维图能够显示两个独立不变量与细胞相对数之间的关系，横坐标和纵坐标分别为与细胞有关的两个独立参数，平面上每一个点就表示同时具有相应坐标值的细胞存在。可以由二维点图得到两个一维直方图，但是由于兼并现象的存在，二维点图的信息量要大于两个一维直方图的信息量。

2.4.2 鉴定不同来源干细胞常用的表面标志

2.4.2.1 胚胎干细胞的标志物

(1) Oct-4：Oct-4(也叫 Oct-3 或 Oct3/4)属于 POU 转录因子一员，最初鉴定为 DNA 结合蛋白，可通过顺式元件活化基因转录(Scholer et al. 1990)。它能在全能胚胎干细胞(ES)和生殖细胞中表达(Niwa et al. 2000)。其表达对于维持干细胞的自我更新和多能性是必要的(Pesce et al. 2001)。ES 的分化可导致 Oct-4 的下调。Oct-4 不仅是细胞系多能分化的主

要调节因子，而且也是鉴定全能 ES 细胞的首要标志物。

(2) SSEA(stage-specific embryonic antigens)：即阶段特异性胚胎抗原，最初是用来鉴定识别糖脂表位的三个单抗，这些与糖链相关的分子的生物学功能被认为是调控发育期的细胞膜间的相互作用(Fenderson et al. 1990)。SSEA-1 在前移植期的鼠胚表面(即 8 细胞期)以及畸胎瘤干细胞表面表达，但在其衍生的分化细胞表面不表达(Solter et al. 1978)。输卵管上皮、子宫内膜、附睾，成年鼠脑和肾小管区域也发现和 SSEA-1 抗体的反应(Fox et al. 1981)。SSEA-3 和 SSEA-4 在卵子发生时合成，存在于卵母细胞、受精卵和早期卵裂球细胞膜上(Shevinsky et al. 1982)。未分化的灵长类 ES 细胞、未分化的人 EC(胚胎癌)和 ES 细胞仅表达 SSEA-3 和 SSEA-4，只在分化时表达 SSEA-1，而未分化的小鼠 ES 细胞仅表达 SSEA-1(Henderson et al. 2002)。

人 ES 细胞表达的细胞表面标志物还包括肿瘤排斥抗原(TRA-1-60 和 TRA-1-81，均为高分子质量的糖蛋白)以及碱性磷酸酶(AKP)，这些标志物的表达同样也是其他灵长类未分化 ES 和人 EC 细胞的特征(Carpenter et al. 2003)。

2.4.2.2 造血干细胞的标志物

(1) CD34(细胞表面的唾液黏蛋白)：CD34 分子是 I 型跨膜糖蛋白，自被发现以来一直是研究者兴趣的焦点，其选择性地表达于早期造血干细胞(HSC)、造血祖细胞、小血管内皮细胞和胚胎纤维母细胞表面。骨髓和外周血来源的 CD34 阳性富集的细胞群体中大部分显示出造血活性(Link et al. 1996)。CD34 被认为是造血干/祖细胞的标志物，它会随着细胞的分化逐渐减少直至消失，尽管 CD34 功能未知，但现在认为它参与早期造血过程(Sutherland et al. 1992)。近年来 CD34 使 HSC 标志物的理论受到挑战。Osawa 等首先证明拥有完全再建能力的小鼠 HSC 可以是 CD34 阴性(Osawa et al. 1996)。人的 CD34 阴性细胞也有低水平的嫁接和造血能力。移植研究发现胎绵羊 CD34 阴性细胞有重新繁殖的能力，并且也有证据表明人和鼠的 CD34 阳性细胞可能来源于 CD34 阴性细胞(Nakamura et al. 1999)。这些报告提示，HSC 可能是 $CD34^+$或 $CD34^-$。只选择表达 CD34 的细胞可能导致将更原始的干细胞排除在外，但目前几乎所有的临床和实验流程包括体外培养、基因疗法和 HSC 抑制，都设计成收集富含 $CD34^+$的细胞。

(2) CD133：CD133 是 120kDa 的糖基化蛋白，包括 5 个跨膜结构域，最初是通过 AC133 单抗鉴定的，它能识别人 HSC 的 $CD34^+$亚类(Yin et al. 1997)。CD133 可以作为用 CD34 筛选 HSC 和体外扩增的补充。$CD133^+$富集的亚群与 $CD34^+$富集的亚群的扩增方式相似，可保留多系增殖的能力(Kobari et al. 2001)。最近的研究为 CD133 的表达不限于原始血细胞提供了证据，同时也确定了非造血组织中一类独特的细胞群体。来源于外周血的 $CD133^+$祖细胞可在体外被诱导分化为内皮细胞。并且，人的神经干细胞用抗 CD133 的抗体可被直接分离(Uchida et al. 2000)。

(3) Sca-1：Sca-1(stem cell antigen 1，Ly-6A/E)，即干细胞抗原 1，是 18kDa 的磷脂酰肌醇锚定蛋白，属 Ly-6 抗原家族成员(Rijn et al. 1989)。Sca-1 被广泛认为和 Ly-6 半抗原一起，是小鼠 HSC 标志分子，它在多能 HSC 上表达(Spangrude et al. 1988)。$Sca\text{-}1^+$ HSC 可在成年骨髓、胎儿肝脏、成年动物流动的外周血和脾脏中找到。Sca-1 在几种非造血组织中也被发现，可用来富集 HSC 之外的祖细胞(Welm et al. 2002)，可能参与 B 细胞和

T 细胞活化的调节过程。

(4) c-kit：c-kit 即 CD117，为原癌基因，可编码一种穿膜酪氨酸激酶的受体分子。应用单克隆抗体证明此分子可存在于造血干细胞膜上，其后证明它的配体分子是 SCF(Linnekin et al. 1999)。它是信号传导分子，对造血干细胞的分化具有重要作用。

(5) ABCG2：ABCG2(ATP-binding cassette superfamily G member 2)，是 ABC 转运体家族的成员，广泛存在于各种干细胞上，其特异性表达决定了侧群(side population，SP)细胞的 Hoechst 阴性染色表型(Zhou et al. 2001)。ABCG2 在 CD34 阴性细胞上出现的概率最大，但细胞表达 CD34 后，ABCG2 会下调。ABCG2 的下调在很多造血祖细胞中也有所表现。因此在原始 HSC 的分离鉴定上，ABCG2 比 CD34 更有希望。移植骨髓来源的 SP 细胞可以再生心肌和骨骼肌细胞这一结果证明了 SP 细胞的潜在可塑性(Jackson et al. 2001)。ABCG2 在 SP 细胞上的专一表达提示 ABCG2 可能是成体多能干细胞阳性筛选的潜在标志物。ABCG2 在干细胞发育生物学中在功能上也扮演着一定的角色。

2.4.2.3 间质干细胞的标志物

STRO-1：对 CD34 阳性骨髓细胞进行免疫而产生的小鼠 IgM 单抗 STRO-1，能识别人骨髓基质成分表达的一种表面抗原(Simmons et al. 1991)。$STRO\text{-}1^+$富集的骨髓细胞亚群有能力分化为各种间质细胞系，包括带有血管平滑肌样表型的支持造血的基质细胞、脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞(Dennis et al. 2002)。STRO-1 作为一种有价值的抗体，可用来鉴定、分离人骨髓基质祖细胞并对其进行功能检测，这些细胞和原始的 HSC 有明显区别。

2.4.2.4 神经干细胞的标志物

(1) Nestin：Nestin 是 VI 型中间丝蛋白，主要表达在中枢神经系统的干细胞中，几乎不在成熟中枢神经细胞中表达(Tohyama et al. 1992)。Nestin 在非神经元干细胞中也有表达，如胰岛祖细胞和造血前体细胞。

(2) PSA-NCAM：PSA-NCAM(polysialic acid-neural cell adhesion molecule)，即多唾液酸-神经元黏附分子。胚胎时期的 NCAM 经常会发生高唾液酸化从而显著降低黏附能力，在神经元发育过程中起重要作用(Kiss et al. 2001)。PSA-NCAM 可能和突触的重排和可塑性有关。在成年，PSA-NCAM 的表达仅限制在保留可塑性的区域。神经元限制性的前体细胞可由高表达 PSA-NCAM 鉴定，它们可经历自我更新和分化从而成为多种表型的神经元。

(3) p75 Neurotrophin R(NTR)：p75 NTR，也称为低亲和神经生长因子受体，属 1 型跨膜 TNF 受体超家族(Barker et al. 1992)。神经冠干细胞(NCSC)由于其表面表达 p75 NTR 而被分离(Morrison et al. 1999)。从外周神经组织新鲜分离的 p75 NTR^+ NCSC 在体内和体外均可自我更新并产生神经元和神经胶质细胞。并且神经上皮来源的 p75 NTR^+在培养中也有能力分化为神经元、平滑肌和神经膜细胞(Mujtaba et al. 1998)。因而 p75 NTR 已经被用来作为鉴定间质前体细胞和肝星形细胞的标志分子(Campagnolo et al. 2001)。

以上标记物常单独或联合应用于干细胞研究以鉴别和分离干细胞。随着细胞标记物阴性的干细胞的发现，有些人对使用单一细胞标记物来分离干细胞提出了异议。因此，

利用某些特定成熟细胞的表面标记物来去除成熟细胞而保留干细胞的方法将会在未来占据更大的优势。当干细胞分化为各系的祖细胞时，可出现髓/淋巴各系的专一性标志，如B淋巴系的CD10、髓系的CD33、髓单核系的CD13、红系的CD71、巨核系的CD41/61等，将其统称为Lin(lineage surface antigen)阳性。检测Lin阴性的细胞有助于HSC和造血祖细胞群体的纯化(Wognum et al. 2003)。例如，包含$CD34^+Lin^-$和$Sca1^+c\text{-}kit^+Lin^-$单克隆抗体的组合常被分别用于富集人和小鼠的HSC。

2.4.3 实验材料

(1) 不同来源的干细胞，细胞数不少于5×10^5个/管。
(2) 荧光标记的抗体或抗体及荧光二抗。
(3) PBS。

2.4.4 实验步骤

(1) 将细胞用PBS充分洗涤后重悬于500μl PBS中，如果细胞收集和鉴定不能同天完成，可将充分洗涤后的细胞重悬于1ml 80%乙醇中，置–20℃保存待用。

(2) 按比例加入荧光标记的抗体或先后分别加入无荧光标记的一抗及荧光二抗，避光4℃孵育30~60min。

(3) 充分洗涤，至少3次，减少非特异性标记。

(4) 上机检测，分析结果。

(南　雪　裴雪涛)

主要参考文献

Barker PA, Murphy RA. 1992. The nerve growth factor receptor:a multicomponent system that mediates the actions of the neurotrophin family of proteins. Mol Cell Biochem, 110(1): 1~15

Campagnolo L, Russo MA, Puglianiello A et al. 2001. Mesenchymal cell precursors of peritubular smooth muscle cells of the mouse testis can be identified by the presence of the p75 neurotrophin receptor. Biol Reprod, 64(2): 464~472

Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. 2003. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. Cloning Stem Cells, 5(1): 79~88

Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI et al. 2002. The $STRO\text{-}1^+$ marrow cell population is multipotential. Cells Tissues Organs, 170(2~3): 73~82

Fenderson BA, Eddy EM, Hakomori S. 1990. Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biological significance. Bioessays, 12(4): 173~179

Fox N, Damjanov I, Martinez-Hernandez A et al. 1981. Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in postimplantation mouse embryos and fetal and adult tissues. Dev Biol, 83(2): 391~398

Henderson JK, Draper JS, Baillie HS et al. 2002. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. Stem Cells, 20(4): 329~337

Jackson KA, Majka SM, Wang H et al. 2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J Clin Invest, 107(11): 1395~1402

Kiss JZ, Muller D. 2001. Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. Rev Neurosci, 12(4): 297~310

Link H, Arseniev L, Bahre O et al. 1996. Transplantation of allogeneic $CD34^+$ blood cells. Blood, 87(11): 4903~4909

Mayer-Proschel M, Kalyani AJ, Mujtaba T et al. 1997. Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. Neuron, 19(4): 773~785

Morrison SJ, White PM, Zock C et al. 1999. Prospective identification, isolation by flow cytometry,and *in vivo* self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. Cell, 96(5): 737~749

Mujtaba T, Mayer-Proschel M, Rao MS. 1998. A common neural progenitor for the CNS and PNS. Dev Biol, 200(1): 1~15

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat Genet, 24(4): 372~376

Pesce M, Scholer HR. 2001. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. Stem Cells, 19(4): 271~278

Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N et al. 1990. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. Nature, 344(6265): 435~439

Shevinsky LH, Knowles BB, Damjanov I et al. 1982. Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. Cell, 30(3): 697~705

Simmons PJ, Torok-Storb B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood, 78(1): 55~62

Solter D, Knowles BB. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). Proc Natl Acad Sci USA, 75(11): 5565~5569

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science. 241(4861):58~62. Erratum in:Science, 1989, 244(4908): 1030

Sutherland DR, Keating A. 1992. The CD34 antigen:structure, biology and potential clinical applications. J Hematother, 1(2): 115~129

Tohyama T, Lee VM, Rorke LB et al. 1992. Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. Lab Invest, 66(3): 303~313

Uchida N, Buck DW, He D et al. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 97(26): 14720~14725

Van de Rijn M, Heimfeld S, Spangrude GJ et al. 1989. Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. Proc Natl Acad Sci USA, 86(12): 4634~4638

Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. 2003. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. Arch Med Res, 34(6): 461~475

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD et al. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. Nat Med, 7(9): 1028~1034

第3章 胚胎干细胞体外培养与定向诱导分化

3.1 胚胎干细胞分离培养

3.1.1 饲养细胞培养与饲养层制备

饲养细胞是胚胎来源的干细胞包括胚胎癌细胞(EC)、胚胎干细胞(ES)、原始生殖细胞(EG)等细胞在体外保持对称分裂不分化状态的必要条件。其作用机制不完全清楚。对于小鼠胚胎干细胞，饲养细胞分泌的 LIF 是保持其多能性的原因之一，因此，在某些鼠 ES 细胞培养中，饲养细胞或 LIF 二者有一即可。对于人类胚胎干细胞培养，饲养细胞目前仍是必需的。通常用两类细胞作为胚胎干细胞培养的饲养细胞，即原代培养的胚胎鼠成纤维细胞(MEF)或小鼠成纤维细胞 STO 系(来源于近交系 SIM 小鼠，thioguanine and ouabain-resistant)。经γ射线照射或丝裂霉素 C 处理以抑制其有丝分裂活性，然后接种至明胶包被的培养皿，作为胚胎干细胞培养的饲养细胞。

3.1.1.1 胚胎鼠成纤维细胞的分离与培养

MEF 可从任一品系的小鼠分离，需从 1 或 2 只孕母鼠中取 10 个以上胚胎。

1) 试剂和材料

(1) 孕 13~14 天母鼠，见栓当天确定为孕 1 天。

(2) 无菌解剖器械：眼科剪 2 把、眼科镊 2 把、玻璃平皿 3 对、小平镊 1 把、组织剪 1 把。

(3) 无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS，0.05% 胰蛋白酶溶液/0.53mmol/L EDTA，10mg/ml DNase 溶液。

(4) MEF 生长培养基：高糖型 DMEM，含 10%胎牛血清。

(5) 35mm、60mm 和 100mm 组织培养皿。

2) 分离方法

脱颈处死孕母鼠，打开腹腔，取出子宫，放在盛有 PBS 的玻璃培养皿中，用眼科剪沿子宫纵轴剪开子宫，取出胚胎，去除胎盘、羊膜等胚胎外组织，PBS 冲洗去淤血。用镊子去除胚胎头和内脏。PBS 清洗 2 次，去除血及残余的内脏组织。用眼科剪剪碎残余胚胎，将糊状组织物转移至 20ml 的平底刻度试管，加 5ml 胰蛋白酶溶液、400μl DNase 粗品，以免释放出的 DNA 导致溶液过黏。37℃水浴孵育 30min，或 4℃放置过夜，振荡，然后将上层细胞悬液倒入一装有 10ml MEF 生长培养基的 10ml 离心管，混匀。1000r/min 离心 6min 收集细胞。再将细胞悬于 15ml 生长培养基中，用血细胞计数板计数细胞。10 只 15 天胎鼠可获得 5×10^7~1×10^8 个细胞。每 1×10^6 个细胞悬浮于 10ml MEF 生长培养基，接种至一个 100mm 培养皿。细胞接种后立即贴壁，24h 后更换新鲜 MEF 生长培养基。约 2~4 天后细胞长满，吸除培养液，加入 PBS 清洗 2 次，每皿加入 6~7ml 胰酶，室温孵

育 3~5min。在胰酶消化的每个细胞皿中加 10ml 生长培养基，轻柔吹吸，使细胞分散，再将悬液转移到 50ml 离心管，两块皿的细胞合并到一管中。离心收集细胞，细胞悬于培养液中，1∶3 分加到 3 个 100mm 培养皿中。约 3 天后细胞长满，可以收集细胞冻存于液氮中。

3) MEF 的质量

用上述方法分离的原代胚胎鼠成纤维细胞不纯，主要成分是成纤维样细胞，但还有神经样细胞、心肌细胞以及一些类型不清楚的细胞。传代后杂细胞减少，随传代数增加，细胞成分趋于单一，但细胞的增殖能力降低，3~5 代后细胞基本停止增殖。实验中所使用的饲养细胞传 3 代以内为佳。不过，细胞的增殖能力是相对的，与培养液关系较大，尤其血清的质量对其影响很大。另外，用于分离的胚胎鼠的胎龄也影响所分离细胞的质量与纯度。大于 16 天龄的细胞成分很杂，通常 13~14 天龄较好。

3.1.1.2 冻存与复苏

1) 冻存

(1) MEF 冻存培养基：高糖型 DMEM，含 10%血清、10% DMSO，用前新鲜配制。

(2) 1.8ml 冻存管、1.2ml 冻存管。

(3) 80%~90%汇合的细胞，吸除培养液，PBS 洗 1 次，每个 100mm 皿中加入 0.05%胰酶 6~7ml，室温下孵育 3~5min，每皿加入 10ml 含 10%血清的培养液以中止胰酶的消化作用。然后将细胞悬液转移至 50ml 离心管，1000r/min 离心 5min；细胞沉淀用冻存液悬浮，每个 100mm 皿的细胞加入 4℃预冷的冻存液 1ml。

(4) 每只冷冻管加 1ml 细胞悬液，旋紧盖子，4℃平衡 30min，−20℃放 60~90min，液氮蒸气(约−70℃)中放 2h，然后转移到液氮中长期保存。

2) 复苏

1000ml 烧杯一个，高压灭菌蒸馏水 500ml。将灭菌蒸馏水水浴加温至 37~40℃，倒入烧杯中；从液氮中取出细胞冻存管，立即侵入温水中并快速搅动直至冰晶融化。将融化的细胞悬液转移至装有等体积培养液的锥形离心管中，1000r/min 离心 5min，细胞沉淀用培养液悬浮，每支冻存管的细胞接种至一个 100mm 培养皿。细胞在 30~60min 后即贴壁。第二天更换培养液，去除死亡细胞。2~3 天可传代，或制备饲养细胞。

3.1.1.3 饲养细胞制备

融化冻存的 MEF 细胞，为避免其增殖超过 ES 细胞，要使其停止有丝分裂，然后在适于 ES 细胞生长的培养皿中接种。本文采用两种方法抑制 MEF 细胞的有丝分裂，即 γ 射线照射或加入丝裂霉素 C(10μg/ml)培养 2.5~3h。

3.1.1.3.1 丝裂霉素 C 处理

1) 试剂及材料

(1) 10μg/ml 丝裂霉素 C 溶液：2mg 丝裂霉素 C 粉剂加入 10ml PBS 溶解，过滤除菌，每管分装 0.5ml，−20℃避光冻存。用前每 0.5ml 加入 9.5ml DMEM 液，DMEM 浓度为 10μg/ml。锡箔纸包裹避光，4℃可保存 2 周。

(2) 0.1%明胶溶液：将 5g 明胶加入至 500ml 注射用水中，高压灭菌，浓度为 1%，

4℃保存。使用时取 10ml，加入 90ml PBS，浓度为 0.1%，4℃保存。

(3) 35cm、60cm、100cm 等各种型号的组织培养皿。

2) 操作方法

长至 80%~90%汇合的细胞，吸除培养液，加入丝裂霉素 C 溶液(100mm/6ml、60mm/2ml、35mm/1ml)，37℃孵育 2~3h；吸除丝裂霉素 C 液，加入 6ml PBS 洗 2 次，去除残留的丝裂霉素。加入 6ml 胰酶，室温下孵育 3~5min，加入等体积的含血清培养液以中止消化；细胞悬液 1000r/min 离心 5min；沉淀用培养液悬浮，计数，按 10^5 个/cm^2 细胞密度接种到 0.1%明胶包被(加入明胶溶液，室温下放置 30min)的培养皿。饲养细胞的接种密度以 50%~60%汇合为宜，如图 3.1 所示。

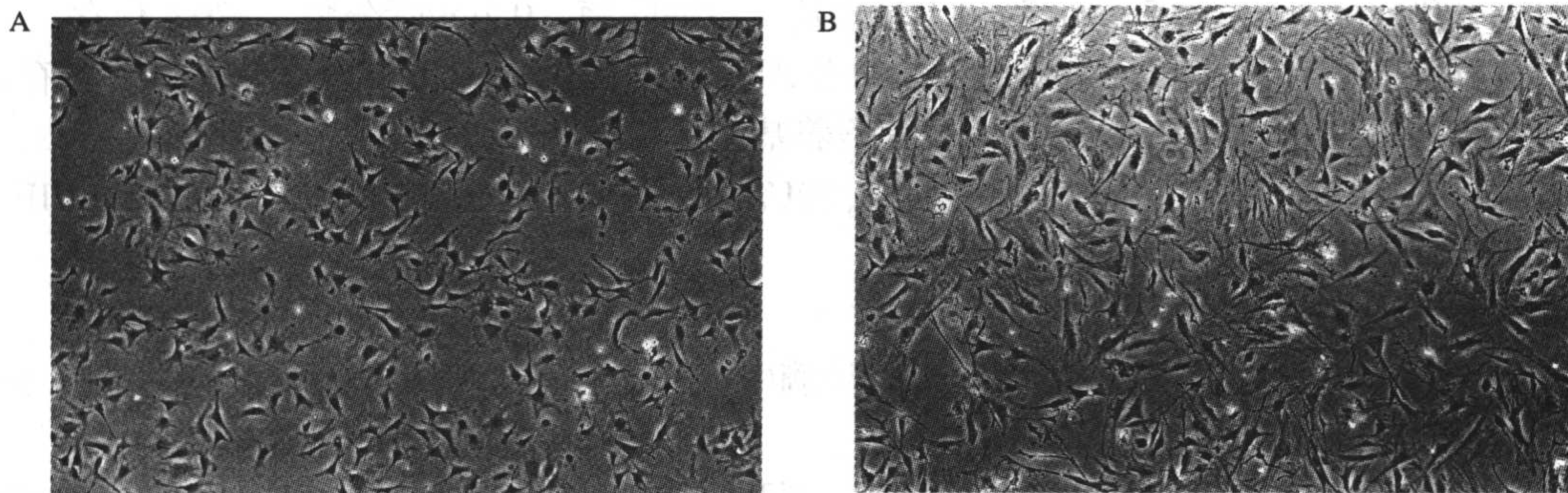


图 3.1　饲养细胞的接种密度照片

A. 合适的饲养细胞密度 50%~60%(40×)；B. 衰老的饲养细胞(40×)

3.1.1.3.2　γ射线照射

将培养在皿中的细胞用相对干净(无菌最好)的盛器如铝盒、搪瓷盒等送至钴源室，照射剂量 25~35Gy，即可灭活细胞的有丝分裂活性，而细胞仍然可以存活一定时间。照射后按上述同样的方法消化、接种至明胶包被的培养皿即可。若钴源设备便利，如离实验室近，可随时使用，γ射线照射的方法简单、效率高。我们通常分离一次，培养出大量细胞，一起照射，然后冻存。使用时，解冻并直接接种至明胶包被的培养皿，第 2 天更换培养液后即可用于胚胎干细胞的培养。

照射剂量须灵活掌握，根据我们的经验，增殖旺盛的细胞照射剂量要大，如原代细胞照射剂量不可小于 30Gy；传代 3~5 代的细胞，照射剂量以 20Gy 为宜，剂量太大，3 天后细胞就大量死亡。

3.1.2　小鼠胚胎干细胞的分离培养

胚胎干细胞来源于囊胚内细胞团(inner cell mass，ICM)，可长期增殖、具有多项分化潜能。自 1981 年小鼠胚胎干细胞培养成功以来，大量研究发现胚胎干细胞能无限增殖、保持正常核型、在体内及离体条件下可分化为机体内所有的组织细胞类型，包括有功能的生殖细胞。小鼠胚胎干细胞是转基因、胚胎发育、细胞分化等研究的重要模型。胚胎干细胞培养的难点在于培养系统不仅要满足细胞增殖的需要，同时在长期培养的过程中要保持细胞不分化。本文首先介绍小鼠胚胎干细胞的分离培养。

3.1.2.1 内细胞团的分离与培养

内细胞团的分离方法有两种：显微分离法与免疫外科法。显微分离法是在显微镜直视下机械性地分离出内细胞团。免疫外科法的原理是：大分子如免疫球蛋白不能通过囊胚滋养外胚层进入囊胚腔，因此利用免疫介导的细胞毒作用，可选择性地破坏滋养外胚层细胞，而囊胚腔内的细胞-内细胞团则不受影响。本文将介绍用免疫方法分离内细胞团。

1) 材料与试剂

(1) 兔抗鼠血清：室温融解，56℃水浴 30min 以灭活补体，过滤除菌，−20℃保存。

(2) 豚鼠血清：成年豚鼠(北医动物中心)1 只，抽心脏血约 5ml，缓慢注入锥形离心管内，2000r/min 离心 15min，吸出上层血清，过滤除菌，0.2ml/管分装，−20℃保存。

(3) 0.5%链霉蛋白酶：10mg 融于 2ml 生理盐水过滤除菌，0.2ml/管分装，−20℃保存。

(4) ES 细胞培养液：高糖 DMEM 培养基，其中含 20% FCS、1% 非必需氨基酸、0.1mmol/L 巯基乙醇、2mmol/L 谷氨酰胺、50U/ml 青霉素、50U/ml 链霉素、1000U/ml LIF。

(5) 129Sv(129/SvpaslcoCrIBR)孕鼠。

2) 操作方法

分离的过程均在石蜡油覆盖的 30μl 液滴中进行；孵育的条件为 37℃、5% CO_2；抗体和豚鼠血清均用 DMEM 培养液稀释。

将见栓 3.5 天的 129Sv 孕鼠脱颈处死，剖开腹部，取下子宫角。用 37℃预热的含血清培养液冲出胚胎。0.5% 链霉蛋白酶消化约 5min 以去除透明带。将去除透明带后的胚胎移入含 10% FCS 的 DMEM 培养液中培养 3h。用免疫溶解法(immunosurgery)去除外滋养细胞，过程如下：将胚胎移入 1∶10 稀释的抗鼠血清液滴中孵育 30min；DMEM 液滴洗 3~5 次，每次 5min；再在 1∶10 稀释的豚鼠血清液滴中孵育 15~30min；DMEM 液滴清洗；然后用尖端直径为 30~40μm 的细吸管轻轻吹打，分出内细胞团，接种到饲养细胞上，37℃、5% CO_2、95% 湿度条件下培养，每天更换培养液。培养液为前述 ES 细胞培养液。

3) 结果

7 个小鼠囊胚(图 3.2)为脱透明带后囊胚，在抗血清中孵育后，移入补体孵育约 5min，外滋养细胞肿胀(图 3.3)，继续孵育 10~25min 后，用细吸管轻轻吹打，可分离出完整的内细胞团(图 3.4)。内细胞团接种后 24h 内贴壁，其中 4 个长出 ES 样细胞，细胞呈集落状，边缘清楚，细胞核大、核仁明显、核浆比高(图 3.5 和图 3.6)。

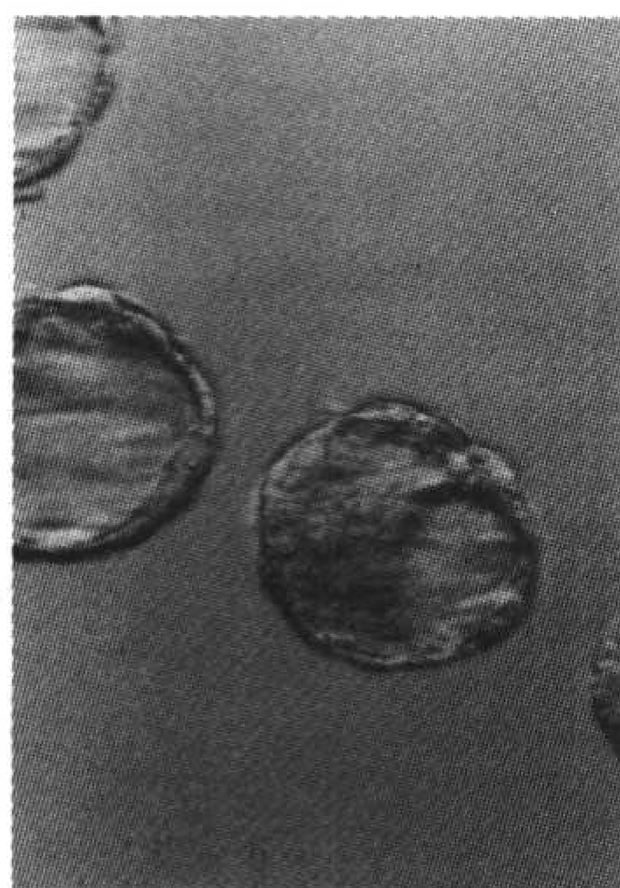


图 3.2 脱透明带后的鼠囊胚

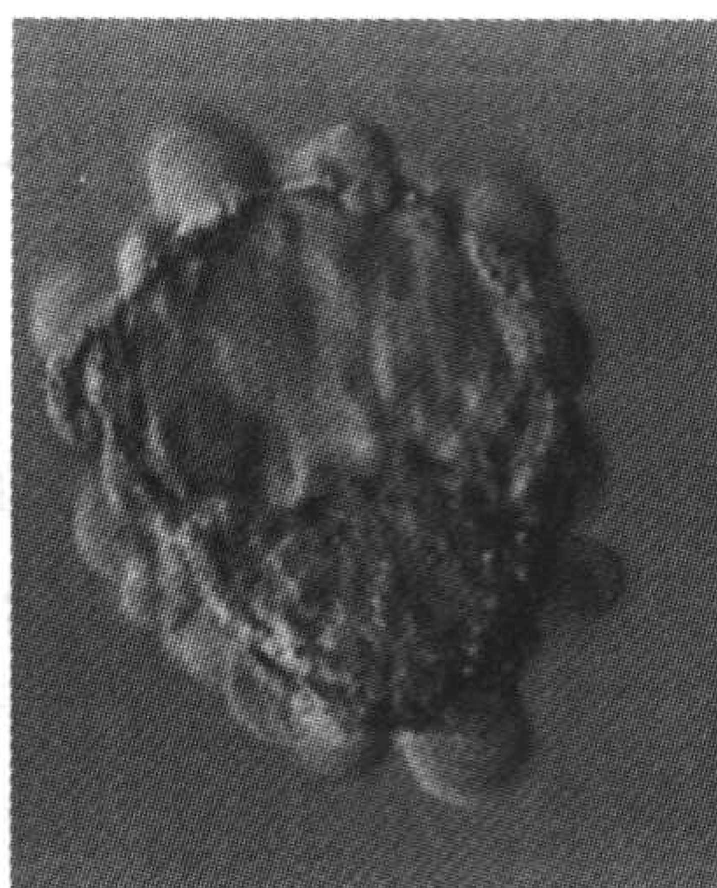


图 3.3 补体作用后外滋养细胞肿胀

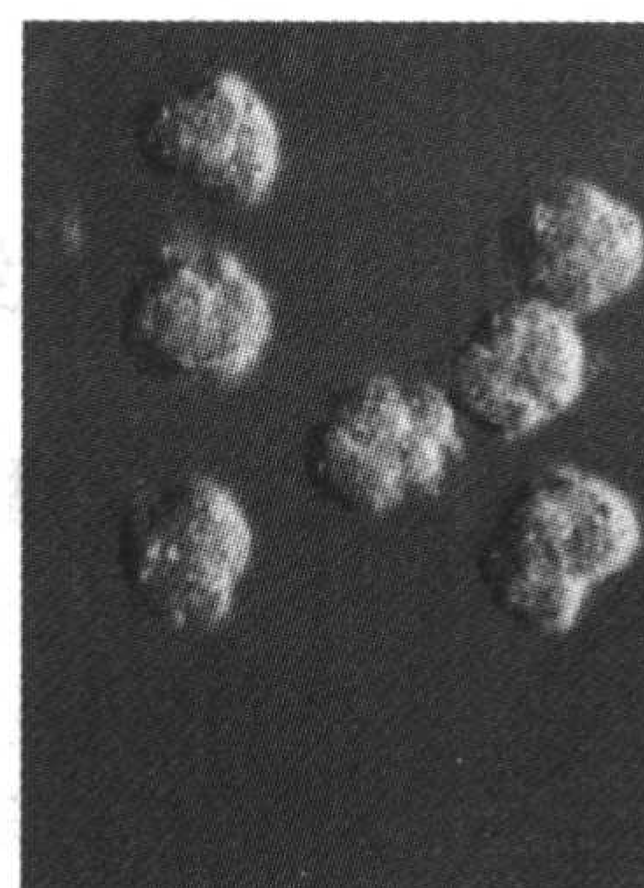


图 3.4 分离出的内细胞团

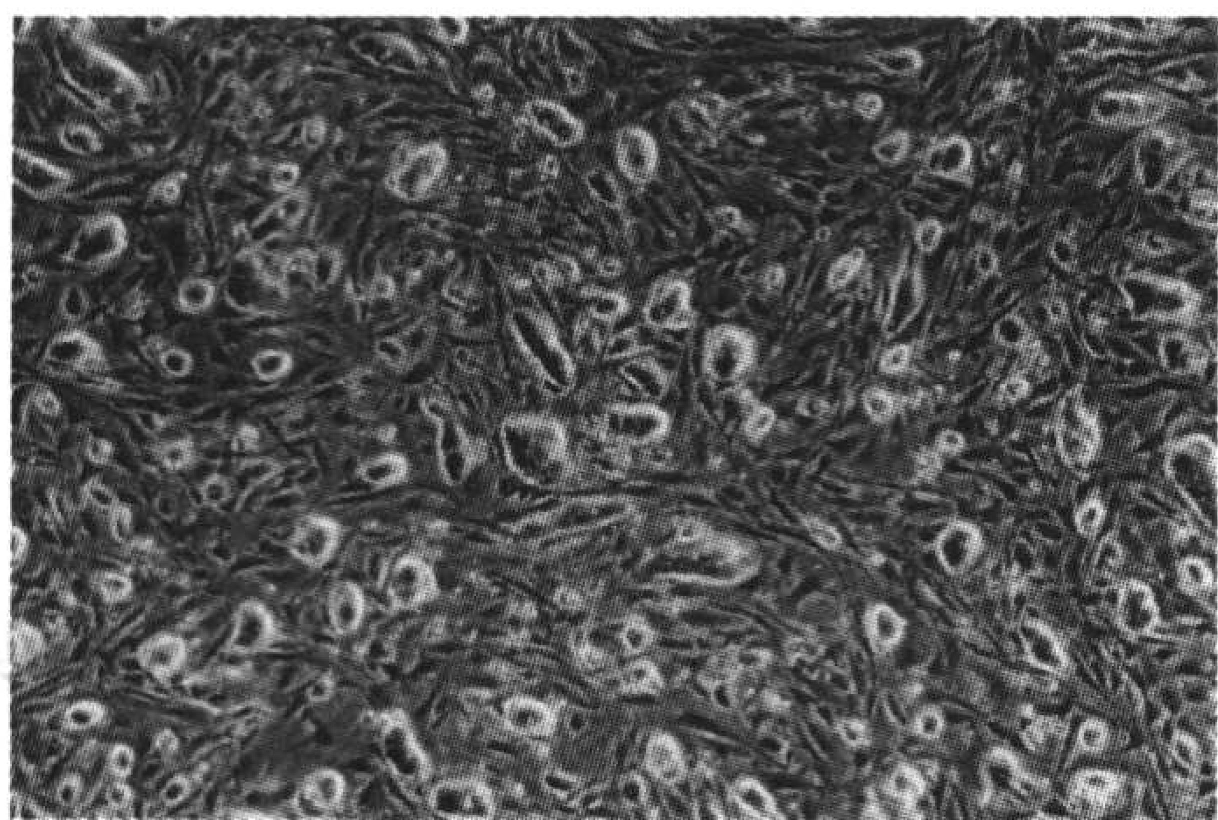


图 3.5　干细胞集落：边界清楚，细胞堆积状

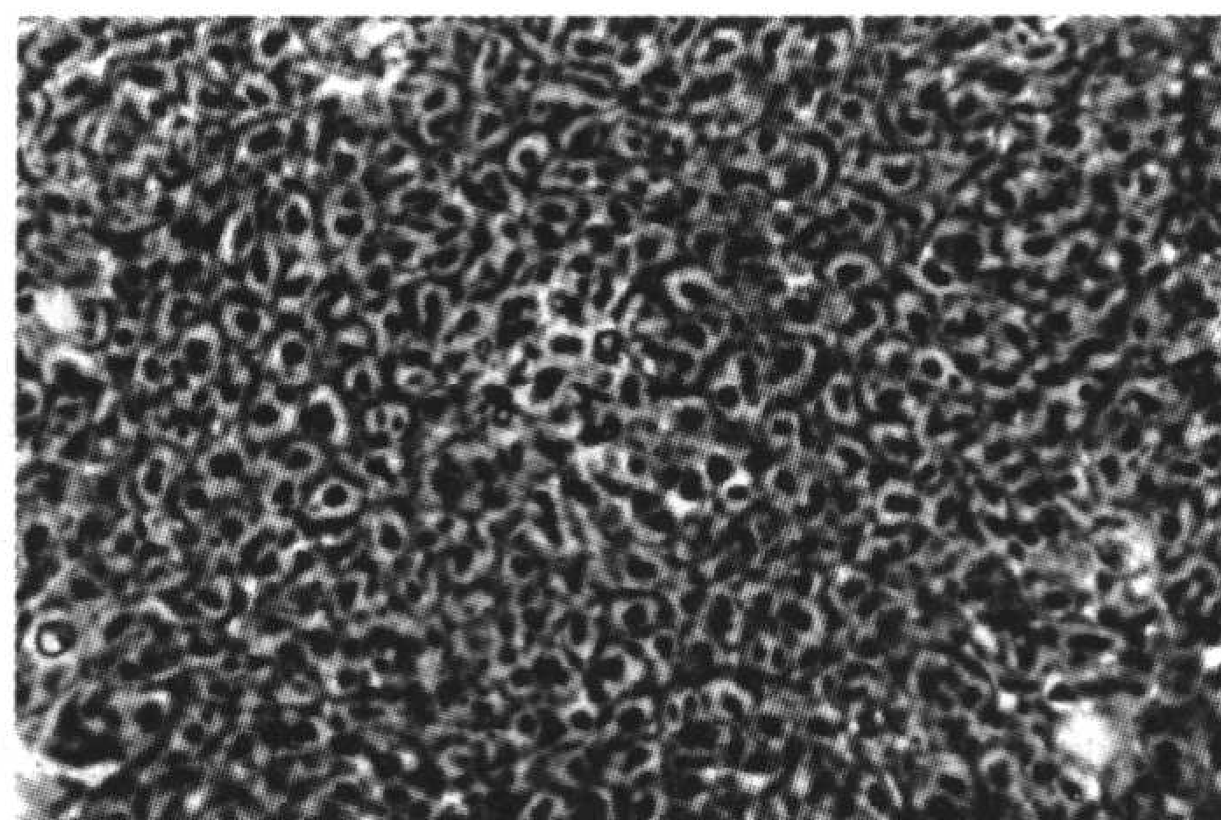


图 3.6　集落内细胞界限不清、核大、核仁明显

3.1.2.2　ES 样细胞扩增

内细胞团接种后 24h 内贴壁，3~5 天可见到具有典型的大核且核仁明显的小细胞长出，将出现此种细胞的细胞团用细玻璃吸管取下，0.01%胰酶消化 2min，细吸管吹打，将打散的单细胞和小细胞团接种到新饲养细胞上，每天更换培养液，培养液同上述内细胞团培养液。3~4 天后可见到典型的干细胞集落，5~6 天后集落长大至直径 100~200μm。将典型集落用机械法取下，0.05%胰酶消化，打散成单细胞，接种至新饲养细胞上，每天更换培养液，2 天后可见到多个干细胞集落。编号为 A 与 G 的 2 个扩增顺利，建立了 2 个细胞系，核型均为 40 XY(图 3.7)。A 系细胞在传代、冻融过程中很易分化，传至 15 代冻存。G 细胞系在传代冻融过程中稳定，第 11 代行单细胞克隆，故单细胞克隆细胞系名为 G_{11}。每 3~4 天用胰酶传代并冻存部分细胞。冻存液含 90%干细胞培养液、10% DMSO。

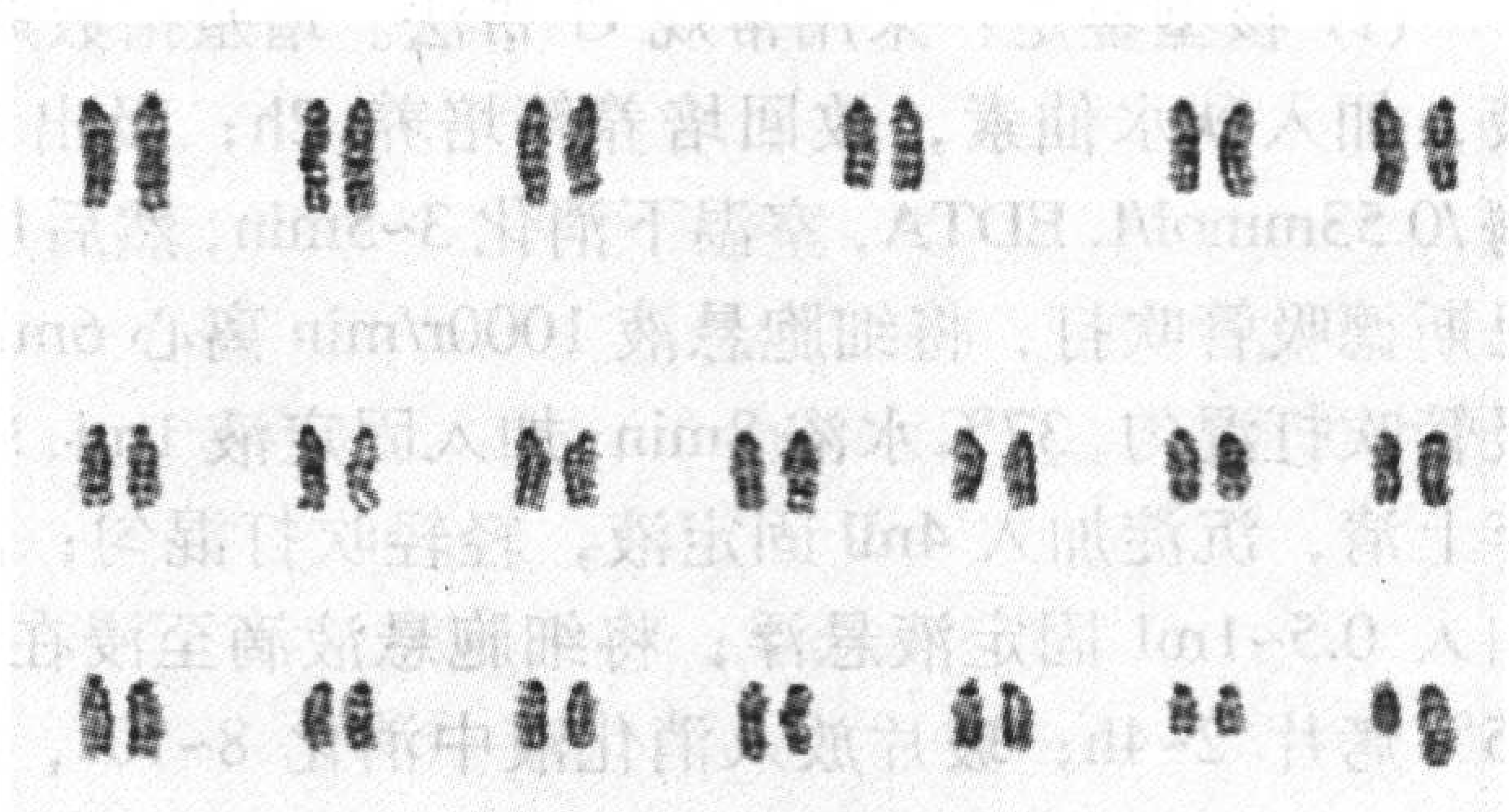


图 3.7　G_{11} 细胞核型 40XY

3.1.2.3　单细胞克隆

核型正常的细胞用胰酶消化以打散成单细胞，接种到 35mm 皿，培养箱中 1h，换液，将贴壁的细胞轻轻吹下，移入另一个皿中，在解剖镜直视下用吸管将单个细胞移入铺有饲养细胞的 96 孔板。隔天更换培养液，约 5~7 天后出现明显集落。胰酶消化打散成单细胞，接种到 35mm 皿，每天更换培养液。每 3 天传代并冻存部分细胞。结果：共接种 192 个孔，生长出 64 个单细胞集落，克隆率为 33%。其中 5 个核型不正常。挑选出核型正常的集落扩增，一旦扩增正常，细胞系即建立。

3.1.2.4　鉴定

1) 材料与试剂

(1) 秋水仙素(Sigma, C9754)：用水配成 5μg/ml 的质量浓度，4℃保存，使用时稀释

至 250ng/ml。

(2) 低渗液：0.075mol/L 氯化钾溶液，置 37℃温箱。

(3) 固定液：甲醇：乙酸＝3：1，使用时新鲜配制。

(4) 消化液：0.2%胰酶，使用时新鲜配制。

(5) Gimsa 染液。

(6) 抗体：大鼠抗 SSEA-1(MC-480)、SSEA-3(MC-631)、SSEA-4(MC-813-70)；鼠抗 TRA-1-60(MAB4360)、TRA-1-81(MAB4381)、OCT-4(MAB4305)。

(7) FITC 标记山羊抗大鼠 IgG(ZF-0312)。

(8) 碱性磷酸酶缓冲液：100mmol/L NaCl、5mmol/L $MgCl_2$、100mmol/L Tris·HCl(pH 9.5)。

(9) 碱性磷酸酶显色底物：NBT/BCIP(SK-5400)。

2) *表面标志及核型鉴定方法及结果*

(1) 核型鉴定：采用常规 G 带法。增殖指数期的细胞(传代后 3 天)，更换新鲜培养液，加入秋水仙素，放回培养箱培养 2h；吸出含秋水仙素的培养液，加入 0.05%胰酶/0.53mmol/L EDTA，室温下消化 3~5min，然后加入等体积含血清培养液以终止消化，巴斯德吸管吹打，将细胞悬液 1000r/min 离心 6min，去上清，向沉淀加入 4ml 低渗液，吸管吹打混匀，37℃水浴 8min；加入固定液 1ml，轻轻吹打混匀；1500r/min 离心 10min，弃上清，沉淀加入 4ml 固定液，轻轻吹打混匀；离心，重复固定 1 次；弃上清，沉淀加入 0.5~1ml 固定液悬浮；将细胞悬液滴至浸在 0℃蒸馏水中的干净玻片上；晾干；65℃烤片 2~4h；玻片放入消化液中消化 8~10s，加生理盐水终止消化；Gimsa 染液中染色 2~4min；自来水冲洗终止染色；晾干，显微镜下观察，Cytoktype5.0 软件进行核型分析。

(2) 碱性磷酸酶检测：采用细胞化学法。在 35mm 皿中培养的细胞，用 PBS 洗 1 遍，4%多聚甲醛室温下固定 30min；PBS 洗 3 遍，每次 5min；加入 1ml 含镁 Tris·HCl 缓冲液(pH9.5)，加入 NBT/BCIP(Vector)各 5μl，混匀，室温下避光孵育直至显色满意；自来水冲洗以终止反应。

(3) SSEA-1 染色：采用免疫组化二步法。鼠抗 MC-480(SSEA-1)购自美国 Iowa 大学染色试剂盒 EliVision™ 购自福州迈新生物技术开发公司，按试剂盒提供的步骤进行操作。培养在 4 孔板中的细胞用 4%多聚甲醛固定，PBS 洗 3 次，每次 5min；每孔加入 300μl 3%过氧化氢，室温下孵育 10min；PBS 清洗 3 次；加入 1：200 稀释的抗 SSEA-1，4℃过夜；PBS 清洗，加入 300μl 增强子聚合物，室温下孵育 30min；PBS 洗 3 次，二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色。

(4) 结果：有正常的 40XY 核型。符合未分化小鼠胚胎干细胞的特征(图 3.7)。细胞的表面标志碱性磷酸酶、SSEA-1 均为阳性(图 3.8 和图 3.9)。

3) *在体分化鉴定方法及结果*

(1) 鉴定方法：约 10^7 个胚胎干细胞，悬浮于 0.1~0.2ml PBS 液中，注入 4 周龄的裸鼠皮下。4~5 周后处死，取出瘤块，4%多聚甲醛固定，石蜡包埋，切片，HE 染色，显微镜下观察。

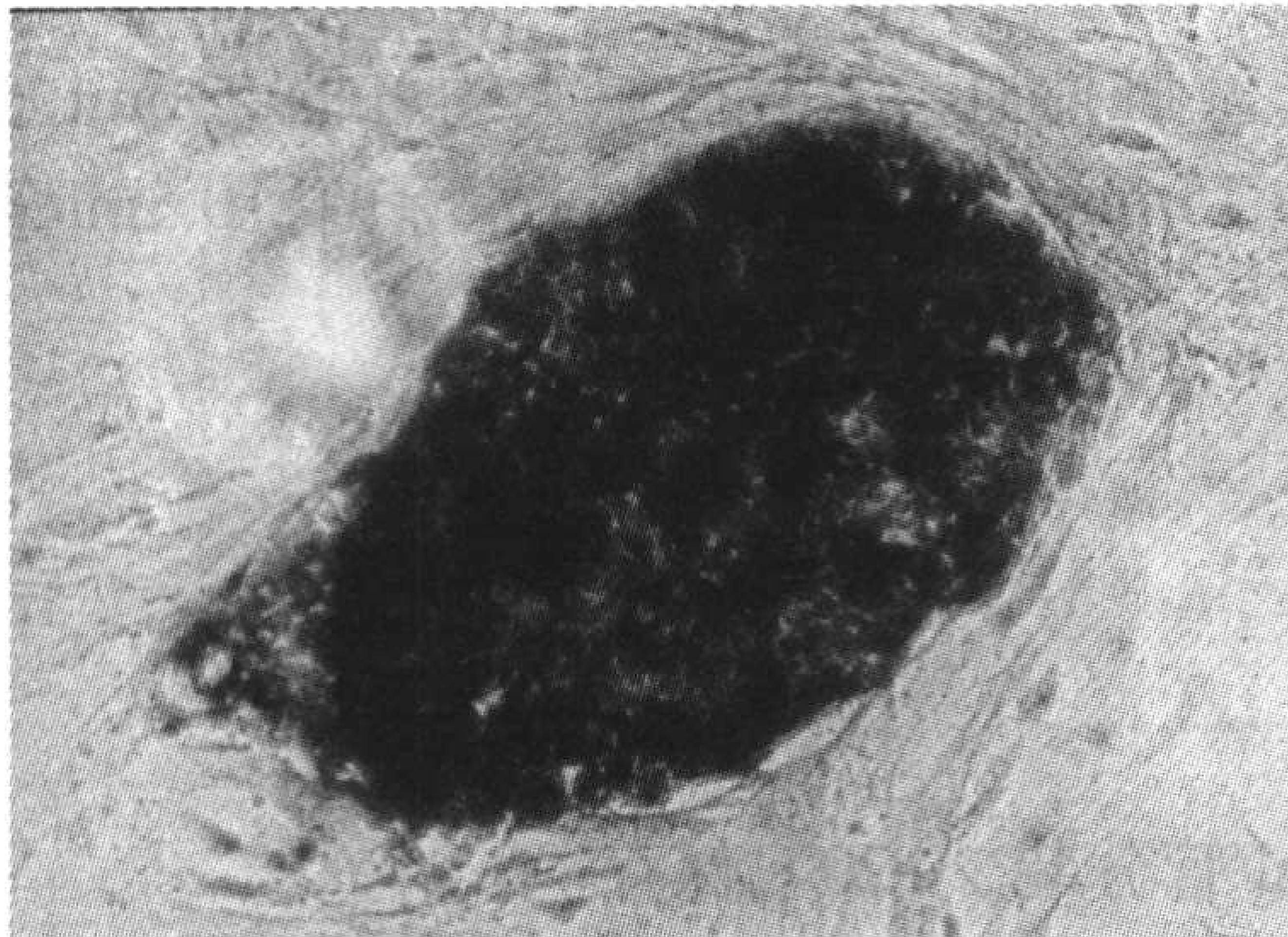


图 3.8　碱性磷酸酶染色阳性(100×)

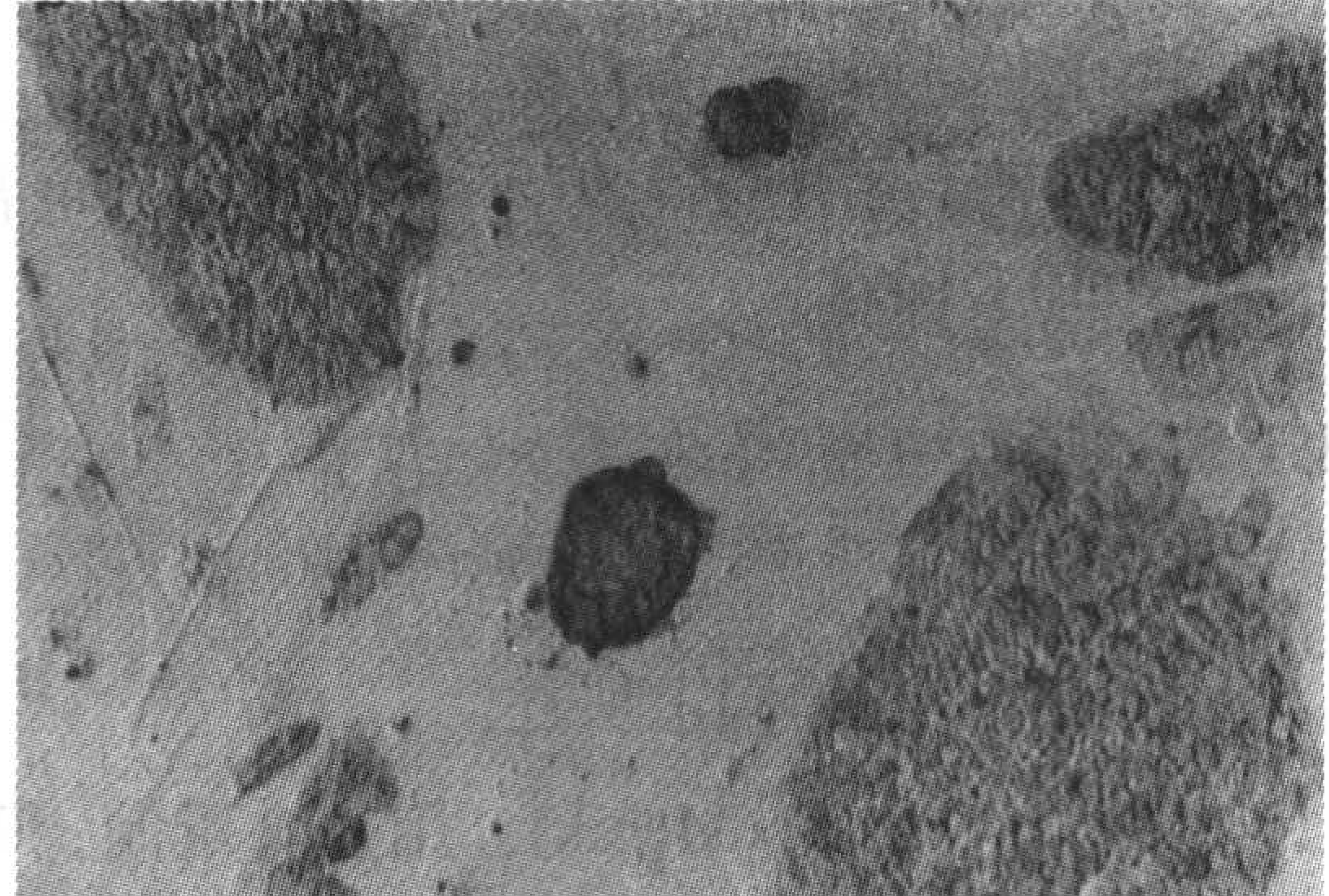


图 3.9　SSEA-1 染色阳性(100×)

(2) 结果：裸鼠皮下注入细胞后两周可触及包块，包块进行性增大。组织学对包块进行鉴定发现其中含有来自 3 个胚层的组织细胞：如来自鳞状上皮组织、神经组织、软骨、柱状上皮等组织的细胞。证实所培养的细胞在体内条件下具有分化为 3 个胚层组织细胞的能力。

3.1.3　人类胚胎干细胞的分离培养

人类胚胎干细胞的分离培养包括：内细胞团的分离、胚胎干细胞的识别、胚胎干细胞的扩增等内容。人类胚胎干细胞成功的分离培养，必须具备以下几个关键条件：①质量良好的囊胚；②有效的内细胞团分离；③可靠、稳定的培养系统；④可靠、有效的传代。

3.1.3.1　内细胞团的分离、培养

在小鼠胚胎干细胞的分离培养中，已经证实免疫外科方法(immunosurgery)是一种可靠、有效的内细胞团分离方法，故本小节采用此方法分离人囊胚内细胞团。

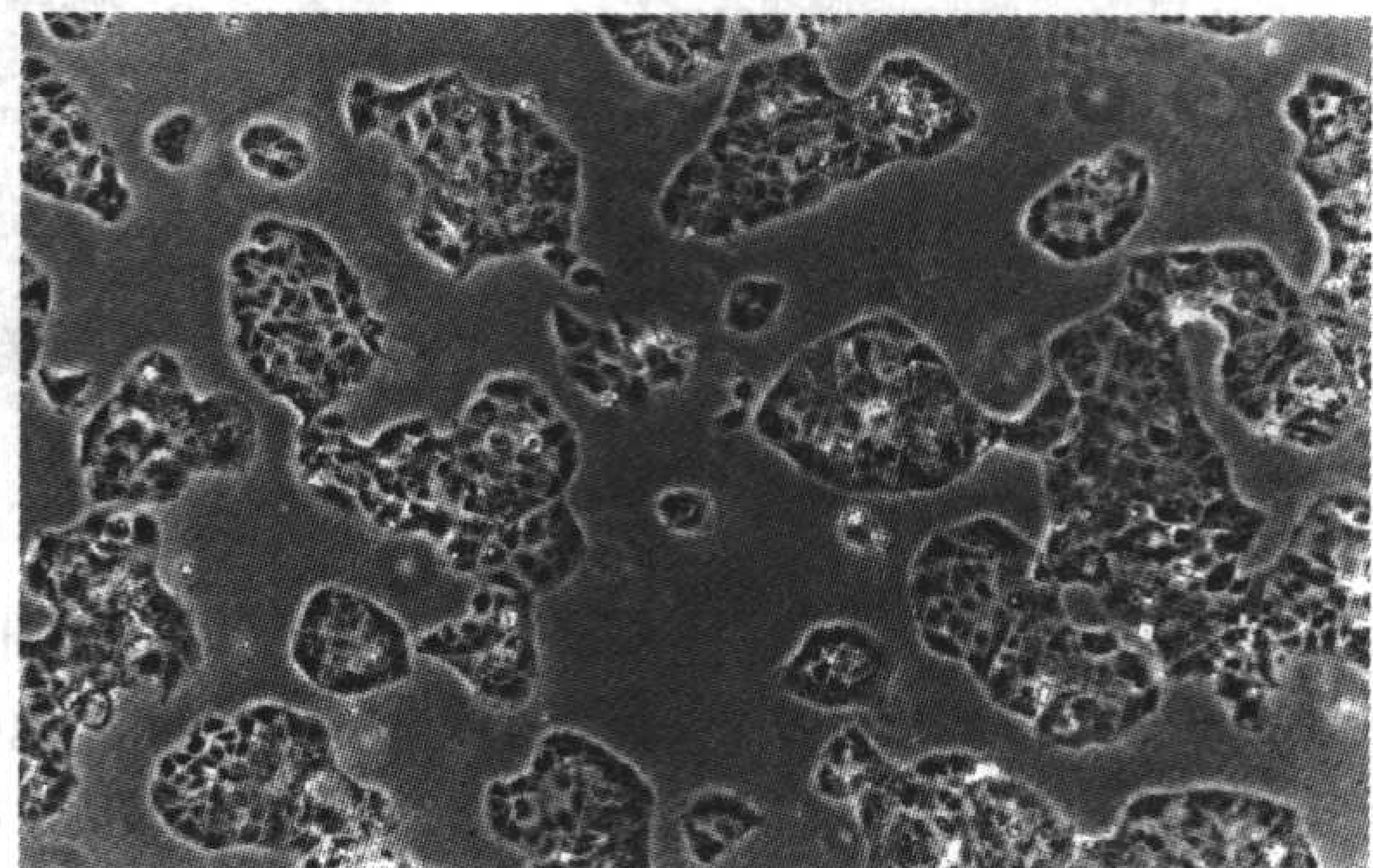


图 3.10　人绒毛膜癌细胞株 JEG-3 细胞(100×)

3.1.3.2　抗血清、补体制备

1) 血清制备

采用人绒毛膜癌细胞株 JEG-3 细胞(图 3.10)对兔进行免疫，制备抗人绒毛膜细胞的抗血清。方法如下：日本大耳白雄兔一只，体重 2.0kg。JEG-3 细胞约 10^7 个，悬浮于 3~5ml PBS 中，将细胞从兔耳缘静脉注入。一天 1 次，连续 3 次。末次注射后第 15 天耳缘静脉抽血 2ml、第 17 天心脏抽血 6ml、第 20 天心脏抽血 12ml 后处死兔。血样室温下放置 30min 后，2500r/min 离心 15min，吸取血清，56℃水浴 30min，灭活补体，过滤除菌，0.5ml/管分装，−20℃保存。

2) 补体制备

采用豚鼠血清作为补体。3 月龄豚鼠 2 只，心脏抽血，每只豚鼠大约可抽 5~6ml 心脏血。血样室温下放置 30min 后 2500r/min 离心 15min，吸取血清，过滤除菌，0.5ml/管分装，−20℃保存。

3.1.3.3 内细胞团分离

1) 试剂

抗血清、补体同上所述。

0.5% pronaseE (Merck)：用 G-2 配制，0.5ml/管分装，−20℃保存。

2) 方法

抗血清、补体均用 DMEM 液稀释。抗血清 1∶50 稀释，补体 1∶10 稀释。反应均在石蜡油覆盖的 30μl 液滴中进行。5~7 天后龄囊胚移入 0.5% pronaseE 液滴中，解剖镜下观察，大约 3~5min 后透明带消失；将消除透明带的囊胚移入 DMEM 液滴中清洗；再将囊胚移入抗血清液滴中孵育 30min；再移入补体液滴中孵育 30min；外滋养细胞肿胀的囊胚移入 DMEM 液滴中清洗；然后用细吸管轻轻吹打，即可分出内细胞团(图 3.11)。

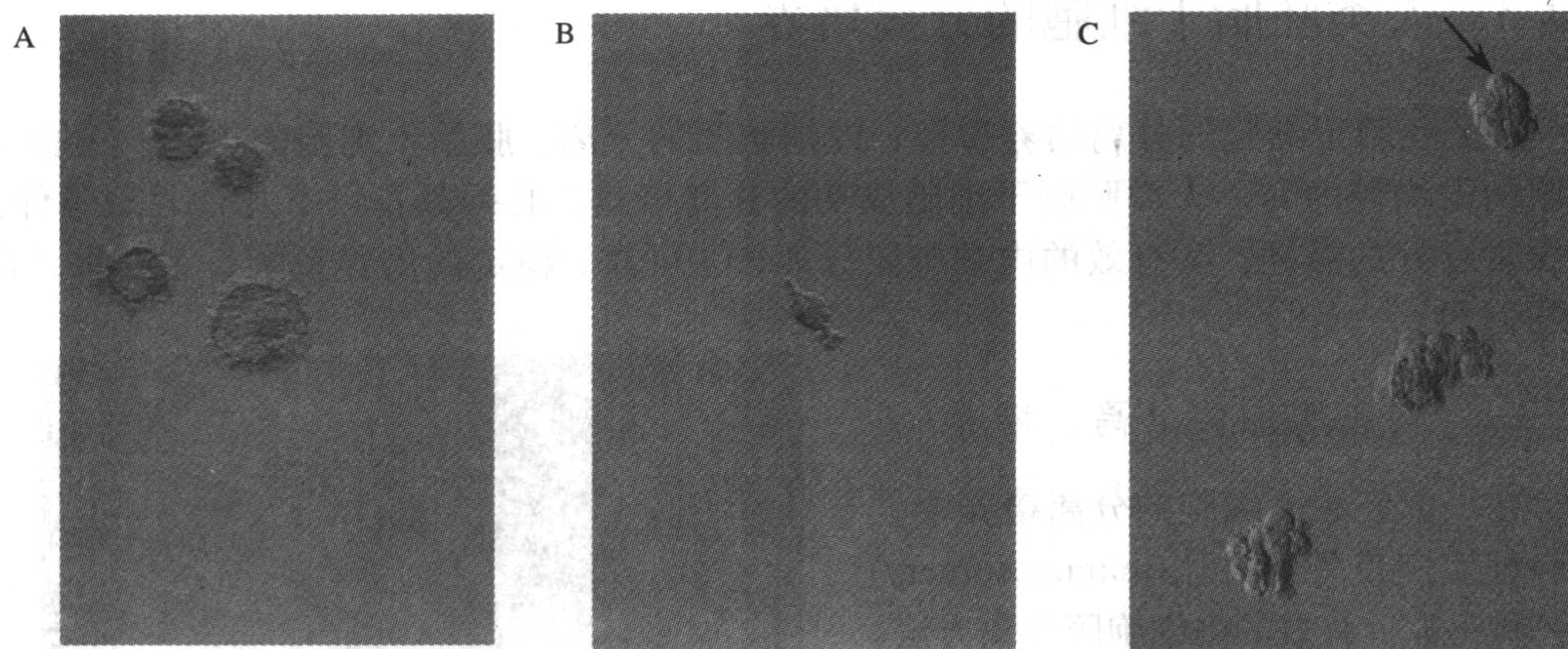


图 3.11 内细胞团分离

A.人囊胚补体作用后外滋养细胞肿胀；B.分离出的内细胞团；
C.分离出的内细胞团(箭头所指)，其余 2 个无明显内细胞团

3) 结果

一共有 30 个囊胚进行分离，其中第 1 个囊胚(6AA 级)因分离条件未成熟，分离时内细胞团与外滋养细胞全部被溶解，其余囊胚内细胞团在 B 级以上者均分出完整的内细胞团共 15 个。

3.1.3.4 内细胞团培养

1) 培养液

Knockout^{TM} DMEM 培养基，含 20% FBS，加入 1%非必需氨基酸、0.1mmol/L 巯基

乙醇、2mmol/L 谷氨酰胺、50U/ml 青霉素、50U/ml 链霉素，此为含血清培养液；将 FBS 换成相同浓度的血清代用品，加入 4ng/ml bFGF，此为无血清培养液。

2) 培养方法

分离内细胞团前一天制备饲养细胞，接种到 0.1%明胶包被的 4 孔板，培养过夜。第 2 天将分离出的内细胞团接种至 4 孔板，37℃、6% CO_2、94%湿度条件下培养。每天更换新鲜培养液。

3) 结果

接种的 15 个内细胞团 24h 内全部贴壁，其中 14 个在 12h 内贴壁，有 1 个 24h 时才贴壁。说明分离出的内细胞团保存了完好的生物学活性。14 个接种至新鲜制备的 MEF 饲养细胞上，5 个凋亡，2 个仅有滋养细胞，另 7 个在增生的滋养细胞中心长出细胞界限不清的小细胞团(图 3.12)，其中 3 个第一代分化，另 4 个增殖旺盛，因此，从 14 个内细胞团培养出 4 个胚胎干细胞系，即 B_4、B_7、PKU_1、PKU_2。一个内细胞团接种在成人子宫内膜间质细胞饲养层，4 天后凋亡。

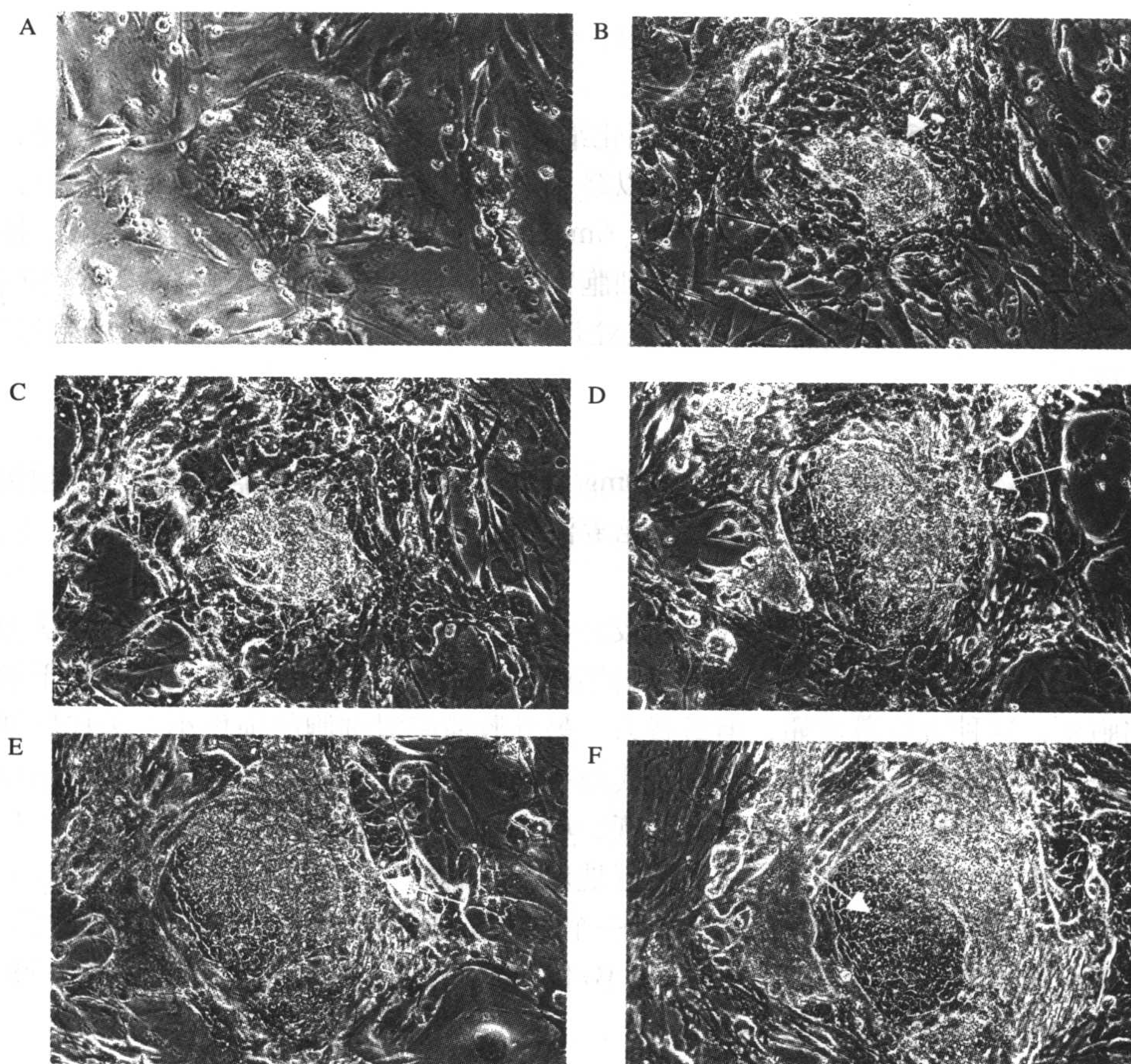


图 3.12　内细胞团培养

A. D_2 内细胞团，在滋养细胞中见小细胞团(箭头所指)；B. D_3 内细胞团，小细胞团长大；C. D_5 内细胞团，小细胞团进行性长大；D. D_6 内细胞团，小细胞团进行性长大；E. D_7 内细胞团，小细胞团长大，见典型 ES 样细胞(箭头所指)；F. D_8 内细胞团，见多个 ES 样细胞区(箭头所指)(100×)

3.1.3.5 ES 样细胞扩增

人类胚胎干细胞的传代比较困难，文献报道有机械法、胶原酶法、Dispase 法、EDTA 法等。集落少时，机械法传代比较有效、可靠。当集落有成百甚至几百个时，机械法几乎是不可用的。本节摸索了多种传代方法，建立了有效的 ES 细胞大量扩增方法。

1) 机械法

将细胞集落切成小块，每小块大约 200~300 个细胞不等。用吸管将细胞小团块接种到新饲养细胞上。细胞团与内细胞团一样在 12h 内贴壁。机械法比较有效、可靠，细胞损失小。但不足之处在于费时、集落大小不一，往往 4 天需传代。

2) 胶原酶法

这种方法是文献中使用最多的人类胚胎干细胞传代方法。用 1mg/ml 胶原酶 (collagenase) IV 消化细胞 10~20min，吹打，将细胞团悬液移入锥形离心管，1000r/min 离心 6min。弃上清液，沉淀用培养液打散，吹打数下，将细胞团分散至一定大小，小于 50 个细胞较好，然后按一定比例(通常按 1∶6)接种至新饲养细胞上。胶原酶的作用较温和，细胞存活良好，但集落分散程度不够，传代后长出的集落大小不一。

3) 胰酶法

用 0.05%胰酶/0.53mmol/L EDTA 消化细胞 3~5min，镜下见细胞回缩、发亮，但未浮起，吸出酶溶液，加入含血清培养液以终止消化作用，然后用巴斯德吸管吹打，将细胞悬液移入锥形离心管，1000r/min 离心 6min，弃上清液，沉淀用培养液打散，按一定比例接种至新饲养细胞上。胰酶消化后细胞集落分散成单细胞和包含有 3~5 个细胞的小团，传代后长出的集落大小均匀；不足之处是消化的时机较难掌握，胰酶对细胞损伤大，细胞易死亡。

4) Dispase 法

Dispase 是作用温和的酶类，常用 10mg/ml 质量浓度，消化细胞 30min，细胞集落完整脱落，然后离心，弃上清液，沉淀用培养液悬浮后，再次离心，加入培养液，吹打，接种至新饲养细胞上。

总之，人类胚胎干细胞的传代目前较公认的方法是机械法和胶原酶法，并认为以小细胞团(50~100 个细胞)传代最有效。有的细胞系自始至终均用机械法，如韩国干细胞中心的细胞系，这种方法最可靠，但最费力。另外胶原酶对细胞的损伤小，传代后细胞的活性良好，是可靠的传代方法。胰酶传代效率高，孵育时间短、细胞分散好，但作用太强，较难操作，细胞易死亡。本研究发现，单个细胞传代只要细胞活性良好，传代后不死亡，细胞生长旺盛，集落均匀，能更好地保存细胞的不分化状态。本研究提及的 4 个细胞系在 3~5 代以内用机械法传，长满一个 35cm 皿后采用胶原酶或胰酶消化传代。4 个细胞系均增殖旺盛，B_4 传 30 代冻存、B_7 传 32 代冻存、PKU_2 传 19 代冻存。PKU_1 仍连续传代、已传 30 代。

3.1.3.6 单细胞克隆细胞系的建立

在人类胚胎干细胞培养之初，认为 hES 在单细胞时很难存活，因此，克隆率很低，小于 1%。本研究在培养传代过程中，发现 hES 分散成单细胞时的存活率与小团状时的

没有明显差别，只是操作过程很难掌握，细胞在消化分散过程中易死亡。因此，如能提高消化后单个细胞的生物活性，就将提高克隆效率。

1) *方法*

本研究使用处于生长指数期的 PKU_1 系细胞(传代后 3 天)，吸出培养液，PBS 洗 2 遍，加入 0.05% 胰酶/0.53mmol/L EDTA 在 4℃消化 5min，吸出胰酶，加入含血清培养液终止胰酶的消化作用；用巴斯德吸管轻轻吹打，将细胞悬液移入到另一个明胶包被的无饲养细胞的 35cm 培养皿中，放回培养箱培养 20min，活性良好的细胞将黏附至皿底；20min 后吸出培养液以及死亡的和未贴壁的细胞，加入新的无血清培养液，将黏附在皿底的细胞轻轻吹下，吸出 50μl 细胞悬液，放入另一个装有 1ml 无血清培养液的 35cm 培养皿，混匀，放置 5min，使细胞沉降至皿底。用尖端口径 20~30μm 的吸管将单个细胞接种至已有饲养细胞的 96 孔板(corning)，每个细胞放入 1 个孔。每天更换培养液。第 7~8 天后可见长出的单细胞克隆。第 12 天用胶原酶消化传代。

2) *结果*

本研究中接种的 96 个细胞长出 2 个单细胞克隆，克隆率约 2%，较文献报道的克隆率高，部分证实了本研究的假设。但是，与小鼠 33%的克隆效率相比，人类胚胎干细胞单细胞克隆率要低得多，说明在低密度状态其生长活性确实较低。

3.1.3.7 小结

本研究采用免疫外科方法分离内细胞团，抗血清为兔抗人绒癌细胞 JEG-3 细胞血清，补体为新鲜豚鼠血清。16 个质量良好的囊胚，除 1 个因分离条件不成熟而损失，其余均分出完整的内细胞团共 15 个。接种至饲养细胞上，所有内细胞团在 24h 内贴壁。14 个内细胞团接种至 MEF 饲养层，培养出 4 个胚胎干细胞系：B_4、B_7、PKU_1、PKU_2。一个接种至由人子宫内膜间质细胞经射线照射后做成的饲养细胞上，8 天后凋亡。

对于人类胚胎干细胞的传代，因其集落少，用机械法传代可靠；而大量的细胞可采用胶原酶或胰酶消化传代。胶原酶温和，传代后细胞活性保存较好。胰酶作用强，作用时间短，细胞分散好，但较难掌控。上文提及到的 4 个细胞系在体外稳定增殖 5~6 个月不等，4 个细胞系均增殖旺盛，B_4 传 30 代冻存、B_7 传 32 代冻存、PKU_2 传 19 代冻存。PKU_1 仍连续传代、已传 30 代。本研究在稳定传代的基础上建立了 2 个单细胞克隆的亚系，这 2 个亚系已传 9 代。

3.1.3.8 人类胚胎干细胞鉴定

人类胚胎干细胞的基本特征包括：来源于囊胚的内细胞团，无限的增殖能力，具有正常核型，在体内、离体条件下均能分化为三个胚层的组织细胞。另外，表达特异的表面标志，如碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)、胚胎阶段特异性抗原(stage-specific embryonic antigen, SSEA)、肿瘤识别抗原(tumor recognition antigen, TRA)等。

3.1.3.8.1 生长形态

4 个细胞系的细胞呈集落状生长，集落形态与灵长类胚胎干细胞和人类胚胎癌细胞的集落形态相似，扁平状，细胞界限清楚；而小鼠胚胎干细胞呈堆积状，细胞界限不清。集落内的干细胞核大、核仁清楚，胞核与胞质的比率高(图 3.13)。

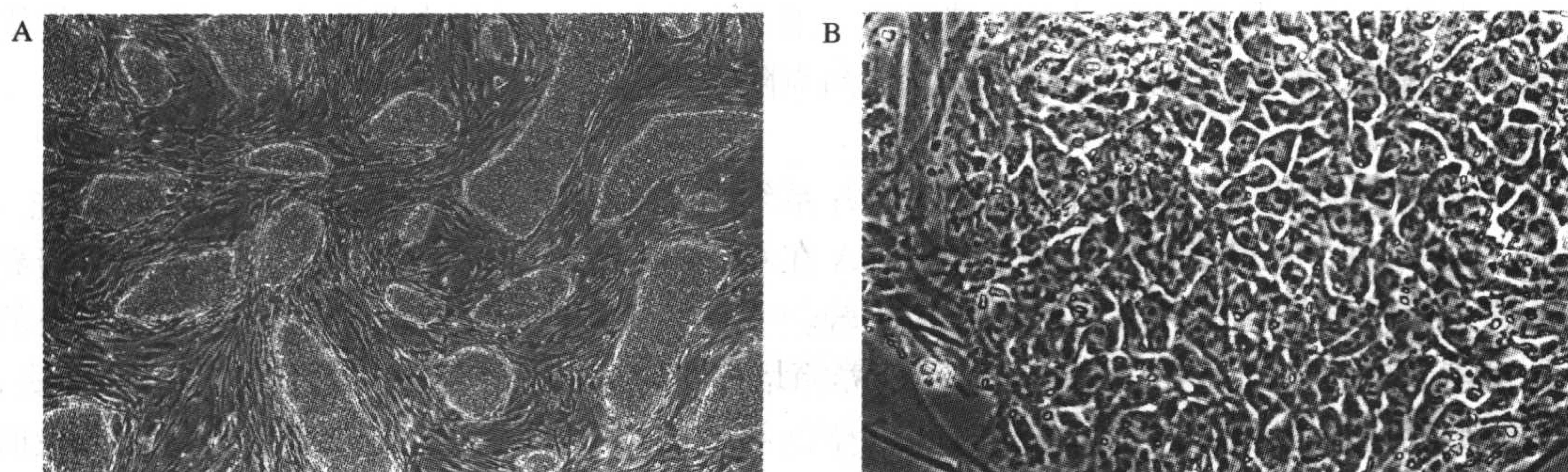


图 3.13　人类胚胎干细胞生长形态

A. hES 集落扁平，边缘清楚；B. hES 细胞边界清楚，细胞核大、核仁清楚、核浆比高

3.1.3.8.2　核型

人类胚胎干细胞的基本特征是核型正常，长时间培养仍然保持正常核型。这是胚胎干细胞与胚胎癌细胞最本质的区别。本研究在细胞传代 8~24 代中多次检测核型，发现 4 个细胞系核型正常且稳定。

(1) 试剂同 3.1.2.4。

(2) 方法同 3.1.2.4。

(3) 结果：4 个细胞系核型均正常，B_4 46 XX、B_7 46 XY、PKU_1 46 XX、PKU_2 46 XY。体外传代数月后核型保持稳定。2 个单细胞亚系与父系核型一样，有正常的 46 XX 核型。

3.1.3.8.3　表面标志

人类胚胎干细胞与未分化灵长类胚胎干细胞及人类胚胎癌细胞相似，表达碱性磷酸酶、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、OCT-4 等表面标志。本研究采用免疫荧光和细胞化学方法检测上述标志。

1) 试剂

(1) 抗体：鼠抗 SSEA-1(MC-480)、SSEA-3(MC-631)、SSEA-4(MC-813-70)；鼠抗 TRA-1-60(MAB4360)、TRA-1-81(MAB4381)、OCT-4(MAB4305)。

(2) FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(ZF-0312)。

(3) 其余同 3.1.2.4。

2) 方法

(1) 碱性磷酸酶检测：方法同 3.1.2.4。

(2) 免疫荧光：所有免疫荧光的反应均在 35mm 组织培养皿中进行。细胞用 4%多聚甲醛固定，PBS 清洗 3 遍，加入 10%山羊血清室温下孵育 30min，以中和非特异结合位点；加入一抗(1∶200 稀释)，4℃孵育过夜；PBS 清洗 3 次，每次 5min，然后加入荧光标记的二抗(1∶50 稀释)，避光 4℃孵育 1h；PBS 清洗 3 次，每次 5min。每皿加入 1.5ml PBS 液，立即在荧光显微镜下观察结果。

3) 结果

本研究所培养的 4 个系细胞均表达碱性磷酸酶、SSEA-3 弱阳性、SSEA-4 强阳性、TRA-1-60 阳性、TRA-1-81 阳性、OCT-4 阳性，而 SSEA-1 阴性，与文献报道的灵长类胚胎干细胞、人胚胎癌细胞以及人类胚胎干细胞表面标志一致(图 3.14)。

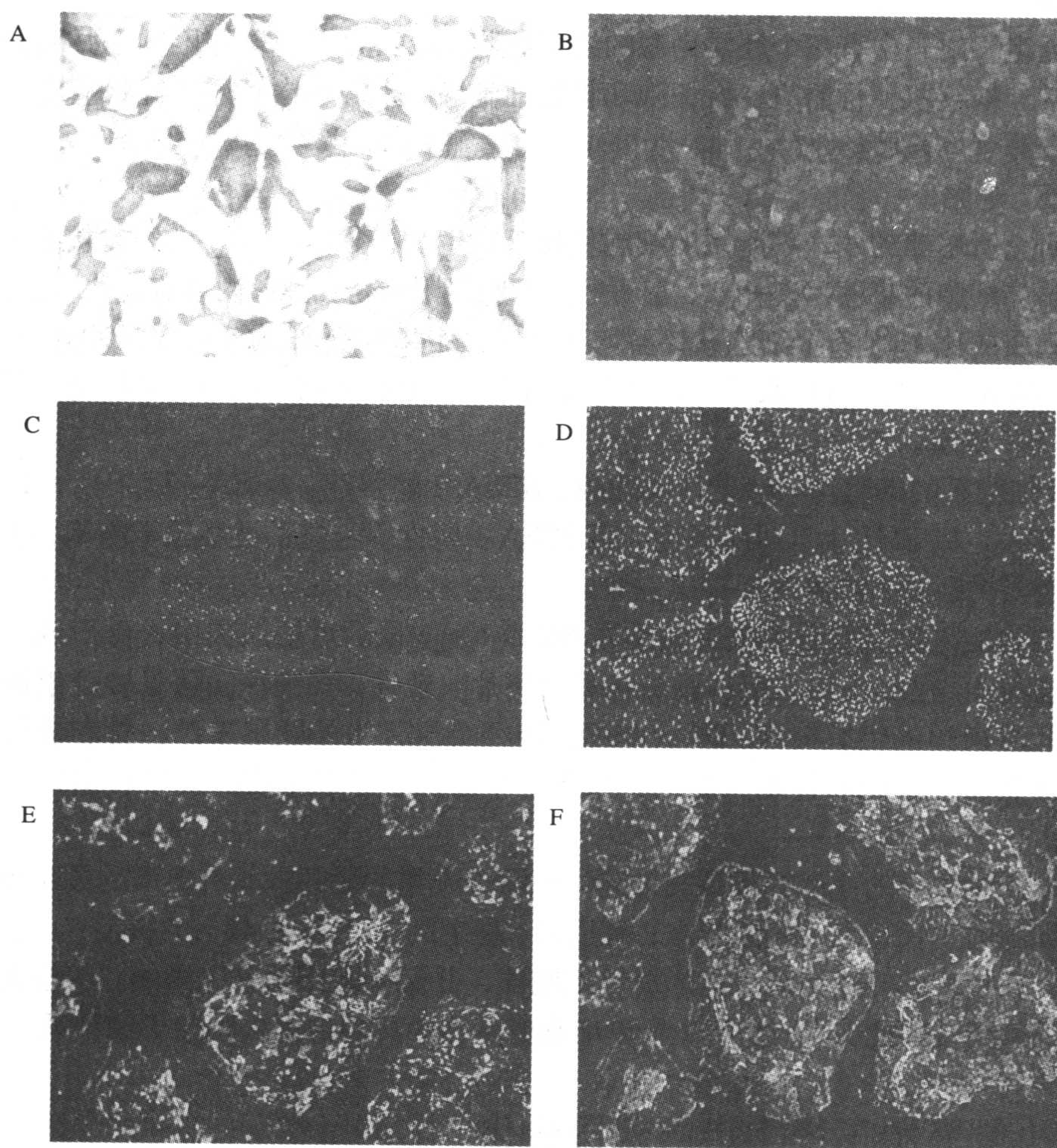


图 3.14 人类胚胎干细胞表面标志

A. 碱性磷酸酶阳性(40×)；B. oct-4 阳性；C. SSEA-3 弱阳性；D. SSEA-4 强阳性；
E. TRA-1-60 强阳性；F. TRA-1-81 强阳性(100×)

3.1.3.8.4 体内分化

将细胞注射入重症联合免疫缺陷小鼠(SCID-biege 鼠)，胚胎干细胞在这种小鼠体内生长、分化、形成包含有三个胚层来源的良性畸胎瘤。

1) *方法*

细胞用胶原酶消化，离心，沉淀用 PBS 悬浮，浓度大约为 10^7 个/ml，用 1ml 注射器将细胞悬液注入小鼠后腿肌肉，每侧 0.1ml(约 10^6 个细胞)。共注射 4 只小鼠，一个细胞系 1 只小鼠，分别注射至两侧后腿。置层流柜中饲养。8~10 周后可见小鼠腿部有肿块长出，16 周处死小鼠，肿瘤用 4%福尔马林固定，石蜡包埋，切片，普通 HE 染色后显微镜下观察。

2) 结果

肿瘤组织中包含有三个胚层来源的组织细胞：鳞状上皮、神经组织，为外胚层来源；骨和软骨、横纹肌、骨骼肌、血细胞和骨髓细胞等，来源于中胚层；柱状上皮、肠管样组织，来源于内胚层。

3.1.3.8.5 小结

本研究所培养的4个细胞系的细胞呈集落状生长，集落形态与灵长类胚胎干细胞和人类胚胎癌细胞的集落形态相似，扁平状，细胞界限清楚；集落内细胞核大、核仁清楚，胞核与胞质的比率高。4个细胞系核型均正常，B_4为46 XX，B_7为46 XY，PKU_1为46 XX，PKU_2为46 XY。体外传代数月后核型保持稳定。2个单细胞亚系与父系核型一样，有正常的46 XX核型。

4个细胞系的细胞均表达碱性磷酸酶、SSEA-3弱阳性、SSEA-4强阳性、TRA-1-60阳性、TRA-1-81阳性、OCT-4阳性，而SSEA-1阴性。与灵长类胚胎干细胞、人胚胎癌细胞以及人类胚胎干细胞表面标志一致。

将细胞注入重症联合免疫缺陷小鼠SCID-biege鼠的后腿肌肉中，可形成良性畸胎瘤。肿瘤用4%福尔马林固定，石蜡包埋，切片，普通HE染色。可见肿瘤组织中包含有三个胚层来源的组织细胞：鳞状上皮、神经组织，为外胚层来源；骨和软骨、横纹肌、骨骼肌、血细胞和骨髓细胞等，来源于中胚层；柱状上皮、肠管样组织，来源于内胚层。

本研究所建立的4个细胞系的细胞均来源于人类的囊胚；具有典型的灵长类和人类胚胎干细胞的生长特点及表面标志；有正常、稳定的46 XX或46 XY核型；可长期培养不分化，保持多向分化潜能；能形成单细胞株，并保持同样的分化潜能。符合人类胚胎干细胞的特征，因此，4个系及2个单细胞亚系均为典型的人类胚胎干细胞系。

3.2 小鼠胚胎干细胞定向诱导分化

3.2.1 诱导小鼠胚胎干细胞分化的常用方法

3.2.1.1 悬浮培养法

小鼠胚胎干细胞在细菌培养皿中培养，细胞不能贴壁而需悬浮，细胞相互黏附在一起，形成小团状，称为拟胚体(embryoid body, EB)。

1) 实验方法

将10^6~10^7个胚胎干细胞接种到90mm细菌培养皿，加入不含LIF的干细胞培养液，每2天更换一次培养液；或者将20~30μl胚胎干细胞悬液滴在细菌培养皿皿盖上，皿内加入10ml PBS液，放入培养箱中培养，2天后，将皿盖上的小细胞团转入皿内继续培养。后一种方法即为悬滴法(hanging-drop culture)，这种方法可使拟胚体的大小比较均一。拟胚体培养6~10天，用不同的培养基、加入不同的细胞因子，拟胚体细胞可向不同的细胞分化。

2) 实验结果

细胞悬浮条件下培养，自动聚集成细胞团，进行性长大，约 3~4 天分化成为囊实性结构，即囊性拟胚体，又称为成熟性拟胚体。一周后拟胚体增大不明显。在拟胚体长大过程中，胚胎干细胞自然分化为各种成熟程度不同的细胞。拟胚体接种到组织培养皿后贴壁、展开，可出现各种组织细胞类型，包括神经细胞、可跳动的心肌细胞、血管内皮细胞等。拟胚体细胞分散后接种至组织培养皿中再加入无血清 N_2 培养液和 10ng/ml 碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)，然后 bFGF 撤退，出现典型神经样细胞。

3.2.1.2 共培养

共培养(co-culture)这种胚胎干细胞诱导分化方法已越来越引起关注。OP9 分离自骨硬化病突变小鼠(po/po mutant mice)头盖骨的间质细胞系，这种细胞不能产生巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)，常用于诱导造血干细胞、内皮细胞、神经细胞的分化。NIH3T3 胚胎鼠成纤维细胞系，可用于诱导神经细胞分化。PA6 分离自头盖骨的骨髓间质细胞系，常用于诱导神经细胞分化，也可用于诱导造血干细胞分化。一种支持细胞可以使胚胎干细胞向不同的方向分化，而分化方向的差别就在于所使用的培养液。

3.2.2 诱导小鼠胚胎干细胞向造血干细胞与血管内皮细胞分化

以向造血干细胞与血管内皮细胞分化为例。在胚胎发生中，中胚层是位于内、外胚层间的一片细胞。当中胚层细胞从上皮样结构分化为间充质细胞时，细胞黏附分子 E-cadherin(上皮性钙黏着蛋白)表达下降，其中一个亚群中的血管内皮生长因子-2(PDGF-2)，在小鼠其被称为胚胎肝激酶-1(Flk-1)，表达升高。Flk-1^+细胞群含有内皮细胞前体。随着胚胎发育，Flk-1^+细胞群在卵黄囊中产生血岛，由圆形造血干细胞及其外围的内皮细胞组成。不表达 Flk-1 的突变鼠不能产生血岛，在胚胎发育早期死亡。另外在中轴旁(paraxial)中胚层中可以识别出表达血小板源性生长因子受体 α (PDGFα) 的细胞群，这群细胞可以产生内皮细胞，而不产生造血干细胞；而 Flk1^+细胞群位于外周(lateral)中胚层，是内皮细胞和造血干细胞的一个共同来源。在血管发生中，起源于中轴旁和外周中胚层的内皮细胞共同形成血管丛，贯穿于卵黄囊和胚体，并改造成分支复杂的血管网。

造血干细胞发生中，首先出现原始红系细胞，其可能来源于外周中胚层。类红系细胞、类髓样细胞和类淋巴细胞均来源于表达血管内皮黏附分子 VE-钙黏着蛋白的内皮细胞。在胚胎发育早期，内皮细胞和造血干细胞的许多标志都是相同的，如 PECAM-1、CD34、AA4 等，这就说明了内皮细胞和造血干细胞在发生过程中的密切关系，因此通过表型将两者分开很困难。

采用悬浮培养和共培养这两种方法均可诱导小鼠胚胎干细胞分化为造血干细胞和血管内皮细胞。本文将介绍共培养方法，即采用 OP9 细胞系作支持细胞。流程图如图 3.15 所示。

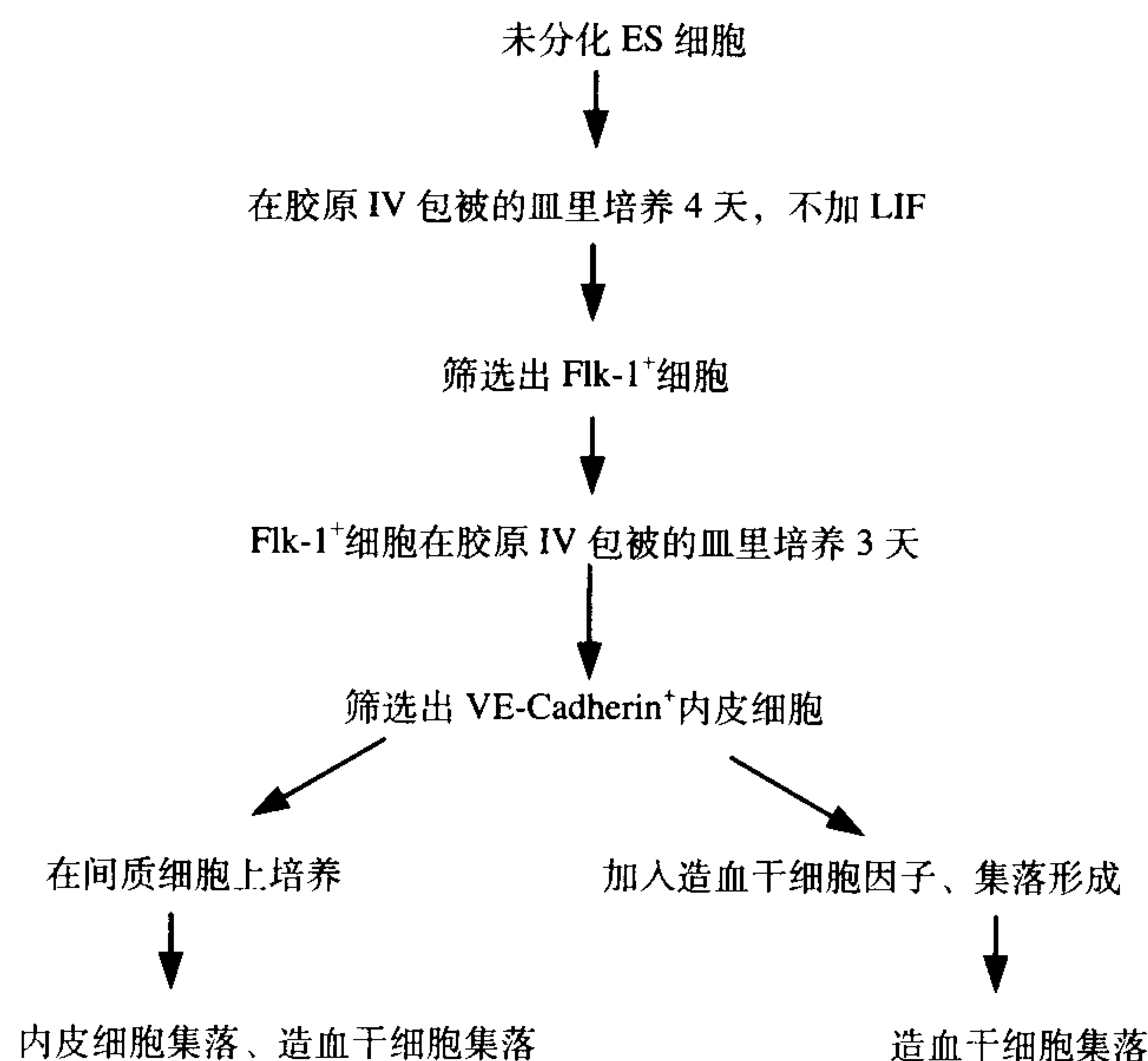


图 3.15 共培养的方法流程

3.2.2.1 试剂

1) ES 细胞分化培养液

MEM、10% FCS、2ME、50U/ml 青霉素、50U/ml 链霉素。

2) OP9 培养液

MEM、20% FCS、50U/ml 青霉素、50U/ml 链霉素。

3) 中胚层细胞分化与纯化试剂

①胶原 IV 包被组织培养 6 孔板；②细胞分散缓冲液；③PBS(无 Ca^{2+}，Mg^{2+})；④anti-Flk-1，荧光标记单抗；⑤anti-E-cadherin, 荧光标记单抗；⑥HBSS/BSA：Hank 平衡盐溶液，加 1% BSA；⑦HBSS/BSA/PI：HBSS/BSA 加 5μg/ml 碘化丙锭。

4) 从 Flk-1^+细胞中分化内皮细胞试剂

①anti-VE-cadherin，荧光标记单抗；②HBSS/BSA、HBSS/BSA/PI。

5) 从内皮细胞中获得造血干细胞试剂

①红细胞生成素(EPO)；②干细胞因子(SCF)；③白细胞介素 3(IL-3)；④白细胞介素 7(IL-7)；⑤Flk-3 配体。

3.2.2.2 方法

1) 中胚层细胞的诱导与纯化

向胶原 IV 包被的 6 孔板中每孔加入 ES 细胞 1×10^4 个，加入 5ml 分化培养液，37 ℃、5% CO_2 条件下培养 4 天。然后吸掉培养液，加入 2ml 细胞分散液 37℃孵育 20min，将细胞从皿底吹下。在细胞悬液中加入小鼠血清(10^7 个/100μl)，冰上放置 20min。加入 anti-Flk-1、anti-E-cadherin，冰上放置 20min，用 HBAA/BSA 洗 2 遍，然后用 HBSS/BSA/PI 悬浮细胞，去除死亡细胞。用流式细胞仪筛选 Flk-1^+/E-$cadherin^-$细胞。中胚层细胞表达 Flk-1，

不表达 E-cadherin。

2) 从 Flk-1$^+$细胞中分化内皮细胞

加 3×10^5 个 Flk-1$^+$/E-cadherin$^-$细胞至胶原 IV 或明胶包被的 6 孔板中，加入 3ml 分化培养液，37℃、5%CO_2 条件下培养 3 天。用细胞分散液收获细胞，细胞悬液中加入小鼠血清(10^7 个/100μl)，冰上放置 20min。加入 anti-VE-cadherin，冰上放置 20min，用 HBAA/BSA 洗 2 遍，用流式细胞仪筛选 VE-cadherin$^+$细胞。

3) ES 源内皮细胞集落分析

在开始培养 Flk-1$^+$细胞前 3 天，在 3 个 6 孔板中接种 OP9 细胞，每孔加入 2ml OP9 培养液。3 天后，OP9 细胞汇合。每孔加入 5000 个 Flk-1$^+$细胞，再过 3 天，在 OP9 细胞上可见一层细胞长出，可继续保持数天。

4) 从内皮细胞获得原始红系细胞

Flk-1$^+$细胞接种至 OP9 间质细胞上，每孔 1×10^4 个细胞，每孔加入分化培养液 2ml、2U/ml EPO，4 天后检测造血干细胞。

5) 从 VE-cadherin$^+$细胞获得造血干细胞

将 VE-cadherin$^+$细胞接种至汇合的 OP9 间质细胞培养瓶内，每瓶加入 1×10^4 个细胞，加入 6ml 分化培养液及各种细胞因子，具体如下：

红系和髓样细胞分化：EPO 2U/ml、CSF 100U/ml、IL-3 200U/ml。

淋巴系分化：SCF 100U/ml、IL-7 60U/ml、Flk-3 配体 50U/ml。

每 3~4 天更换培养液，通常 2~3 天后红系出现、表达 Te-119；5~7 天髓样细胞出现，表达 Cr-1、Mac-1；10~14 天 B 淋巴细胞出现，表达 CD19。

(彭红梅)

主要参考文献

彭红梅，陈贵安. 2004. 单细胞克隆小鼠胚胎干细胞系的建立. 北京大学学报(医学版)，36(4)：431~434

Abbondanzo SJ, Gadi I, Stewart CL. 1993. Derivation of embryonic stem cell lines. Methods in Enzymology, 225: 803~823

Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS et al. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol, 227: 271~278

Smith AG. 2001. Embryonic stem cells. In: Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D.Stem Cell Biology. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 205~230

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282: 1145~1147

第 4 章　成体干细胞分离培养扩增及体外分化

4.1　造血干/祖细胞

造血干细胞是人类发现最早的一种干细胞也是目前为止研究最多的一种干细胞。它具有 2 个重要的特征：①高度的自我更新或自我复制能力；②可分化成所有类型的血细胞。胎儿出生前，胚胎肝脏是主要的造血组织，内含较多的造血干细胞。胎儿 6 个月后，骨髓造血已渐明显，胎肝造血逐渐减少。出生后，造血干细胞主要分布于红骨髓内，约占骨髓有核细胞的 0.5%。另外，脾脏、淋巴组织和外周血中也分布有极少量的造血干细胞。所以人们通常可以从胎肝、骨髓、动员的外周血中分离出造血干细胞。近年来的研究表明脐血中含有较丰富的更原始的、能重建长期造血功能的干细胞，具有较强的自我增殖及多向分化的能力，是造血干细胞又一丰富来源。那么如何从这些造血组织中分离出造血干细胞呢？由于造血干细胞形态上无法与其他细胞相区别，所以只能利用造血干细胞的表面标志对其进行分离，如人造血干细胞标志物的表达情况是：$CD34^+$、$CD38^-$、Lin^-、$C\text{-}kit^+$、KDR^+、$CD133^+$等，我们可以根据需要选择其中的标志性分子进行正性或负性筛选。通过表面标志筛选出的造血干细胞通常含有处于不同发育阶段的造血干、祖细胞，所以我们以下涉及的实验方法统称为造血干/祖细胞的分离、扩增及诱导分化。

研究人员在造血干/祖细胞的体外扩增方面做了大量的工作。建立的培养体系大体可分为三种：基质细胞支持的培养体系、无基质悬浮培养体系和持续灌注式生物反应器。扩增后的造血细胞的造血重建功能可通过体内、体外实验进行评价。体外方法是模拟体内造血微环境，观察造血干细胞在此条件下形成造血细胞集落的能力，可包括以下几个检测方法：①长期培养起始细胞(long term culture initiating cell，LTC-IC)的检测，即培养物在骨髓基质上培养 5~8 周后，种植于含有细胞因子的培养基中可产生混合细胞集落的一组造血细胞群，它代表体外可以检测到的最原始的造血干细胞，是目前体外检测造血细胞质量的最佳方法之一；②延时 LTC-IC：在骨髓或外周血分离出的 $CD34^+$、$CD38^-$ 细胞进行长期培养时，超过标准的 LTC-IC 时间，仍然可以产生混合细胞集落的造血细胞群；③细胞集落形成单位(colony-forming unit，CFU)的检测：包括混合系集落、粒-巨噬系集落、红系集落、巨核系集落等。根据培养细胞经细胞因子刺激后在体外形成的造血集落，确定其中是否含有该系的祖细胞及其数量。体内实验主要是观察造血干/祖细胞植入到经亚致死剂量照射的 SCID 小鼠体内后，可以重建其造血的能力，即鉴定 SCID 小鼠再植细胞(SCID repopulating cell，SRC)。这种方法是目前公认的检测人造血干/祖细胞质量的方法。

在体外通过各种方法对造血干/祖细胞进行扩增的结果是使造血干细胞成分，各系列祖细胞和成熟细胞为主的各阶段造血细胞的数量都得到了扩增，即在造血干/祖细胞扩增的同时也发生了分化。这是造血干/祖细胞扩增所面临的难题。我们可以利用造血干/祖

细胞的多向分化潜能，通过细胞因子的不同组合，定向诱导其分化，从而产生大量功能细胞，如红细胞、树突细胞、淋巴细胞等以满足基础研究及临床应用的需要。

4.1.1 造血干/祖细胞的分离纯化

分离造血干细胞的常用技术是利用细胞的表面标志进行磁性激活的细胞分选(magnetic activated cell sorting，MACS)。在造血干细胞的众多表面标志中，CD34 是最常用的标志性分子，CD34 分子是一种跨膜的唾液黏蛋白，在造血干细胞、一部分造血祖细胞、血管内皮细胞以及胚胎成纤维细胞表面表达。虽然 $CD34^+$细胞不全是造血干细胞，但是所有的造血干细胞均应表达 CD34 分子，所以临床和基础研究多是基于对 $CD34^+$细胞的筛选来富集造血干/祖细胞的。近年来应用胎羊及免疫缺陷小鼠移植模型进行的相关研究表明，将一群不表达 CD34 分子的 Lin^-CD34^-细胞移植到条件受者后，也能重建接受者的长期多系造血及免疫功能。这群 Lin^-CD34^-细胞是比 $CD34^+$造血干细胞更原始的前体细胞。本实验室已经建立了两步法负性筛选 Lin^-CD34^-细胞(白慈贤等 2003)及正性筛选 $CD34^+$细胞的技术。此外，CD133 分子(Miraglia et al. 1999)、KDR 分子(Ziegler et al. 1999)等也被用来分选造血干细胞，其分离步骤与 $CD34^+$细胞分选步骤基本相同，这里就不详述了。

4.1.1.1 免疫磁珠方法分离 $CD34^+$细胞

MACS 是 20 世纪 90 年代初兴起的一种分离细胞的新型技术，人们可以运用该技术在短时间内(≤2h)高效分离 $CD34^+$细胞。整个分离过程依赖于一个可以特异性识别造血干/祖细胞表面 CD34 抗原的抗体，该抗体与磁珠相连，当细胞群(与抗体、磁珠孵育后)通过磁场时，细胞-抗体-磁珠复合物就可以被磁场捕获，而阴性细胞群则会流出磁场。

1) 实验所需仪器及材料

①调温低速离心机；②超净工作台；③二氧化碳孵育箱；④电子天平；⑤流式细胞仪；⑥普通光学显微镜；⑦MACS 磁性分离仪、分离柱；⑧MACS 磁性细胞分离试剂盒(抗 CD34 抗体、磁珠)；⑨脐带血、外周血或骨髓；⑩PBS 缓冲液；⑪甲基纤维素；⑫BSA；⑬EDTA；⑭淋巴细胞分离液；⑮离心管、吸管、培养板等。

2) 单个核细胞的分离(mononuclear cell，MNC)

(1) 肝素抗凝的脐血、骨髓或动员的外周血按 1∶1 的比例与 PBS 混匀，再按 4∶1 的比例与 0.5% 甲基纤维素混匀，室温静置 30min，待红细胞自然沉降至界限分明。

(2) 吸出上清，置于 50ml 离心管中，20℃、1500r/min 离心 5min。

(3) 弃上清，加 5ml PBS 重悬细胞。

(4) 先在 10ml 离心管中加入 5ml 人淋巴细胞分离液(Ficoll-Hypaque 液)，再缓慢沿管壁加入 5ml 细胞悬液，20℃、1500r/min 离心 20min，可以看出液体由上至下分成 PBS、MNC、Ficoll-Hypaque 液、红细胞共 4 层。

(5) 收集界面单个核细胞，用 PBS 洗涤。

(6) 用 PBS 悬浮细胞计数，备用。

3) $CD34^+$细胞的分离纯化

(1) 用 300μl 分离缓冲液悬浮单个核细胞，分别加入 $CD34^+$细胞分离试剂盒中的试

剂 A1(非特异性阻断抗体)、A2(CD34 特异性单抗 QBEND-10)各 100μl，轻轻混匀，冰上孵育 20min。

分离缓冲液：PBS、0.5% BSA、2mmol/L EDTA。

(2) 加 500μl 分离缓冲液，4℃、3000r/min 离心 3min，弃上清。

(3) 用 400μl 分离缓冲液悬浮细胞，加入试剂 B(结合 50nm 磁珠的 IgG)100μl，轻轻混匀，冰上孵育 20min。

(4) 加 500μl 分离缓冲液，4℃、3000r/min 离心 3min，弃上清。

(5) 再用 1ml 分离缓冲液重新悬浮细胞，制成单细胞悬液。

(6) 将分离柱固定于 MACS 磁场内，用 2ml 分离缓冲液冲洗分离柱。

(7) 将单细胞悬液缓慢贴壁加入分离柱，避免产生气泡；用 2ml 分离缓冲液洗涤。

(8) 将分离柱移出磁场，用 1ml 分离缓冲液加压洗脱，收集 $CD34^+$细胞，进行细胞计数，备用。

4) $CD34^+$ 细胞纯度的检测

(1) 取 1×10^5 个分离的 $CD34^+$细胞，PBS 离心洗涤后用 100μl PBS 重悬。

(2) 加入 PE 标记的 CD34 单克隆抗体 20μl，4℃孵育 30min。

(3) PBS 洗涤 2 次，重悬于 PBS，流式细胞仪检测。

5) 结果

16 份脐带血标本的体积、分离的单个核细胞及 $CD34^+$ 细胞数量等结果见表 4.1(本实验室数据)。所采集的脐带血标本的体积和细胞含量有显著的个体差异。经 MACS 分离纯化后，$CD34^+$细胞纯度可达 85%~98%。

表 4.1　16 份脐带血标本中造血细胞的含量

项目	中位数	范围
体积	80.0	38.0~120.0
WBC/(10^9 个/L)	8.2	4.2~14.8
MNC 回收率/%	78.6	62.8~90.4
MNC 总数/10^8 个	2.64	1.62~12.8
$CD34^+$ 细胞/%	0.52	0.28~0.68
总 $CD34^+$ 细胞数/10^6 个	2.76	0.64~4.52

6) 注意事项

(1) 注意无菌操作。

(2) 收集的脐带血在分离前最好保存在 4℃，时间不超过 4h。

(3) 收集的骨髓细胞在分离前最好保存在 4℃；分选前，先将样品过 30μm 的筛网以去除细胞团等。

(4) 收集的外周血在分离前最好保存在 4°C，时间不超过 8h。

(5) 在分离单个核细胞前应尽量去除红细胞。

(6) 与 A1、A2、B 试剂的孵育时间要充分，以使抗原抗体及磁珠能有效地结合。

(7) 在标记过程中，升高温度或延长孵育时间，可能会增加非特异性反应。

(8) 操作中，要避免细胞悬液中产生气泡，应尽可能使用脱气的分离缓冲液。

(9) 如果样品中出现血小板凝集或血小板黏附在细胞上的情况，可通过低速离心(200*g* 离心 10min)去除血小板。

4.1.1.2 Lin^-CD34^- 细胞与 Lin^-CD34^+ 细胞的分离

根据造血干细胞的表面特征：$CD34^+$、$CD3^-$、$CD7^-$、$CD8^-$、$CD10^-$、$CD14^-$、$CD15^-$、$CD19^-$、$CD20^-$、$CD33^-$(其中 CD10、CD19、CD20 是 B 淋巴细胞的标志，CD3、CD7、CD8 是 T 淋巴细胞的标志，CD14、CD15、CD33 是成熟髓细胞的标志)，可以通过去除成熟细胞的负筛选方法对造血干细胞进行富集。不想要的成熟细胞被相应的抗体和胶体磁珠颗粒标记，在通过磁场时与分离柱结合而被留在磁场内，收集流出液即为相对处于早期的干/祖细胞(Lin^- 细胞)。Lin^-细胞可进一步用来筛选 $CD34^+$或 $CD34^-$细胞。

4.1.1.2.1 实验所需仪器及材料

参考“免疫磁珠方法分离 $CD34^+$细胞”的内容。

4.1.1.2.2 单个核细胞的分离

(1) 具体步骤同“免疫磁珠方法分离 $CD34^+$细胞”中的单个核细胞的分离步骤。

(2) 用 1ml Lin^- 细胞分离缓冲液悬浮细胞，移入 1.5ml Ep 管中，计数。

Lin^-细胞分离缓冲液：PBS、5% FBS。

4.1.1.2.3 Lin^- 细胞的分离(StemSep™ 分离系统)

1) 免疫磁珠的标记

(1) 在每 1ml 细胞(2×10^7~8×10^7)中加入 100μl 针对特异性标志(CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66b、CD41 和血型糖蛋白 A)的单克隆抗体混合物以进行标记，混合均匀。

(2) 冰上孵育 30min 或室温孵育 15min。

(3) 每 1ml 细胞(2×10^7~8×10^7)中加入 60μl 磁珠胶体，混合均匀；冰上孵育 30min 或室温孵育 15min。

2) 柱子安装

(1) 将磁架竖直放置，磁铁置于其上。

(2) 从无菌袋中取出柱子，注意不要碰到柱子下端的接头。

(3) 将柱子安置在磁铁上，注意接头不要碰到磁铁和磁架。

(4) 从无菌袋中取出三接头的活塞，接在柱子上。

(5) 取出钝末端的针头[保留针头上的盖子直到以下的步骤(10)——洗柱]，将其连接在活塞上；检查所有连接处。

(6) 移去柱子顶部的塞子。

(7) 设置三接头活塞，使液体可以从侧连接处进入柱子。

(8) 将一个无菌的注射器装满 PBS，除去气泡，连接到三接头活塞的侧面。

(9) 缓慢推动注射器上的活塞，将 PBS 压到柱子中，直到 PBS 达到柱内基质填充面以上。注意不要让气泡进入网眼状基质中。

(10) 洗柱：在针头下端接一个废液缸，移去针头上的盖子，从柱子顶端加入 Lin^-细胞分离缓冲液。旋转三接头活塞，使缓冲液从柱子流到针头。

(11) 持续加入分离缓冲液，直到收集到 8ml 液体。

(12) 当液面刚好到柱中基质面以上时，旋转活塞，以阻止缓冲液继续从柱中流出。这时的柱子已为分离细胞做好了准备。

注意：在初始化、洗柱、加样过程中，任何时候都不要让柱子流空。

3) 细胞的分离

(1) 从柱子顶端加入待分离的样品——单个核细胞。

(2) 旋转活塞，使分离缓冲液通过针头进入收集管，让样品进入柱子的基质中。加入分离缓冲液，直到收集到 3 倍柱体积的液体(8ml)。旋转活塞，阻止缓冲液继续流出。收集到的流出液即为要富集的 Lin^-细胞。

(3) 室温，1500r/min 离心 5min，弃上清。

(4) 用 1ml 分离缓冲液重悬沉淀，移入 1.5ml Ep 管中，进行细胞计数。

(5) 让柱中的剩余液体流入废液缸。

(6) 拆下三接头活塞。

(7) 从磁铁上端移出柱子。

(8) 丢弃使用过的柱子、注射器、活塞等。

(9) 4℃离心洗涤细胞：3000r/min 离心 3min，弃上清。

4.1.1.2.4 从 Lin^- 细胞中分离 $CD34^-$和 $CD34^+$细胞(MiniMACS 分离系统)

(1) 用 300μl $CD34^+$ 细胞分离缓冲液悬浮 Lin^- 细胞，分别加入试剂 A1(封闭试剂)、A2(修饰的 CD34 抗体，QBEND-10)各 100μl，轻轻混匀，6~8℃孵育 20min。

分离缓冲液：PBS、0.5% BSA、2mmol/L EDTA。

(2) 补加 500μl 分离缓冲液，4℃、3000r/min 离心 3min，弃上清。

(3) 用 400μl 分离缓冲液重悬细胞，加入试剂 B(磁珠胶体)100μl，轻轻混匀，6~8℃孵育 20min。

(4) 补加 500μl 分离缓冲液，4℃、3000r/min 离心 3min，弃上清。

(5) 用 1ml 除气的分离缓冲液重悬细胞，制备单细胞悬液。

(6) 将分离柱固定于 MACS 磁场内，用除气的分离缓冲液 2ml 冲洗分离柱。

(7) 将单细胞悬液缓慢贴壁加入分离柱，避免产生气泡，用 2ml 除气的分离缓冲液洗涤，收集洗脱组分即为 Lin^-CD34^- 细胞。

(8) 将分离柱移出磁场，用 1ml 分离缓冲液加压洗脱，收集 Lin^-CD34^+ 细胞的组分。

4.1.1.2.5 注意事项

参考“免疫磁珠方法分离 $CD34^+$ 细胞”的内容。

4.1.2 造血干/祖细胞的扩增

4.1.2.1 基质细胞支持的造血干/祖细胞扩增

Dexter 等在 1977 年建立了骨髓液体培养体系。此培养法的基础是建立骨髓基质细胞支持层(包括成纤维细胞、巨噬细胞、脂肪细胞、内皮细胞和网状细胞等)，形成二维空间结构，该培养体系不但提供了营养、细胞因子，而且提供了类似于体内的细胞-细胞关系，通过模拟体内造血微环境，实现造血干细胞的长期培养。我们可以根据实验需要自行分离培养骨髓基质细胞，或购买已经建系的基质细胞，如 MS-5、HESS-5 等。

1) 实验所需材料

①成人骨髓或小鼠基质细胞系；②IMDM、α-MEM；③马血清、胎牛血清；④β-巯基乙醇；⑤氢化可的松；⑥造血生长因子 FL、SCF 等；⑦明胶；⑧胰酶；⑨离心管、吸管、培养板等。

2) 成人骨髓基质细胞的培养

(1) 取自无血液病或原发病未涉及骨髓的有核细胞，悬浮于长期液体培养体系(long-term culture medium，LTC-medium)中，种入 T-25cm^2 组织培养瓶中，培养 3~4 周，每周半量换液，并洗去未贴壁细胞。

长期液体培养体系：IMDM、12.5% 马血清、12.5% 胎牛血清、10^{-4} mol/L β-巯基乙醇、10^{-6} mol/L 氢化可的松。

(2) 待细胞生长至 80%~90%汇合后，可收集基质细胞，冻存于液氮中。直至共培养一周前，复苏细胞。

(3) 在共培养之前的 72h，用 15Gy γ 射线照射骨髓基质细胞。

(4) 照射后 48h，用 0.25% 胰酶消化细胞，并以 6×10^4~8×10^4 个/ml 密度接种于 24 孔板中，经 24h 重新贴壁后即可用于共培养。

3) 小鼠基质细胞系的培养(Issaad et al. 1993)

(1) 将 MS-5 基质细胞系培养于添加了 10%胎牛血清的α-MEM 培养液中。细胞生长汇合后，仍可以维持数周，不需要传代培养。

(2) 共培养前，为防止基质细胞提前脱落，可预先用 1%明胶包被 24 孔板，随后将未照射的 MS-5 细胞按 4×10^4 个/ml 的密度铺于 24 孔板中。

4) 共培养

(1) CD34$^+$ 造血干细胞的分离纯化(见本节第一部分内容)。

(2) 按 2×10^3~5×10^3 个/ml 密度将造血干细胞接种于预先铺有基质细胞的 24 孔板中，添加长期液体培养体系，或添加造血生长因子如 FL、SCF 等。

(3) 将细胞置于 5% CO_2，饱和湿度的 37℃孵箱中培养。每周半量换液。

(4) 每周做细胞计数，流式细胞仪检测 CD34 分子的表达情况及造血集落分析(具体步骤见下文)等，以评估共培养体系对造血干/祖细胞的扩增效果。

4.1.2.2 细胞因子支持下的造血干/祖细胞扩增

很多造血生长因子(hematopoietic growth factor, HGF)对造血干/祖细胞的增殖分化都具有重要的调控作用。这些因子包括 SCF、FL、IL-6、IL-11、IL-12、LIF、G-CSF 和 TPO 等。人们通过实验证明多因子组合对于造血干/祖细胞的扩增是非常必要的。但由于不同来源、具有不同表面标志的分离的造血干/祖细胞对细胞因子的反应有所不同，而可扩增造血干/祖细胞的因子又很多，所以人们尝试的细胞因子组合也比较多。下述方案(Gammaitoni et al. 2003)是扩增造血干/祖细胞效果较好的方案之一。

1) 准备以下材料和试剂

①成人骨髓或小鼠基质细胞系；②IMDM；③胎牛血清；④造血生长因子 FL、SCF、TPO、IL-6 等；⑤MethoCult^{TM}GF+H4435 培养基；⑥MyeloCult H5100 培养基；⑦氢化可的松；⑧胰酶；⑨小鼠抗人 CD34 单克隆抗体；⑩离心管、吸管、培养板等。

2) $CD34^+$ 造血干/祖细胞的分离纯化

见本节第一部分。

3) 细胞培养

按 2×10^3~5×10^3 个/ml 密度接种 $CD34^+$ 细胞于 24 孔板中，添加扩增培养液(1ml/孔)。将细胞置于 5% CO_2，饱和湿度的 37℃孵箱中培养 5 周。

造血干/祖细胞扩增培养液：IMDM、10% 胎牛血清、SCF 50ng/ml、FL 50ng/ml、TPO 10ng/ml、IL-6 10ng/ml。

4) 细胞计数及检测

每周半量换液。并做细胞计数，流式细胞仪检测 CD34 分子的表达情况等。

5) 造血祖细胞集落分析

(1) 配制培养体系：自行配制，或使用公司提供的甲基纤维素培养基 MethoCult™ GF +H4435(Stem Cell Technologies)。

甲基纤维素培养基：IMDM、1.0%甲基纤维素、30%胎牛血清、1%牛血清白蛋白、10^{-4}mol/L β-巯基乙醇、2mmol/L 谷氨酰胺、SCF 50ng/ml、GM-CSF 20ng/ml、IL-3 20ng/ml、IL-6 20ng/ml、G-CSF 20ng/ml、Epo 3U/ml。

(2) 接种扩增前的 $CD34^+$ 细胞(1×10^3 个/ml)、扩增后的细胞(5×10^4 个/ml)，于 5% CO_2、饱和湿度的 37℃孵箱中培养 28 天。

(3) 在培养 14~21 天时，对集落形成单位总数(total colony forming unit in culture, CFU-C)进行计数，包括粒-巨噬细胞集落形成单位(clony forming unit-granulocyte/macrophage，CFU-GM，在 20×解剖显微镜下检测半透明细胞数≥50 的集落数)，红系爆式集落形成单位(burst-forming unit-erythroid，BFU-E)和多系或混合集落形成单位(clony forming unit-mix，clony forming unit-granuloid/erythroid/macrophage/megakaryocyte，CFU-Mix/CFU-GEMM)，在第 28 天计数高增殖潜能集落形成单位(high proliferative potential-colony forming unit，HPP-CFU)(检测细胞数>50 000、直径>0.5mm 的致密大集落)。

6) LTC-IC (long term culture initiating cell)分析

(1) 骨髓基质细胞的培养：见步骤“3)细胞培养”。

(2) 贴壁骨髓基质细胞铺满瓶底后，用 15Gy γ 射线照射细胞。

(3) 用 0.25%胰酶消化细胞，并以 7×10^3 个/cm^2 的密度接种于 24 孔板中，经 24~48h 重新贴壁后即可用于共培养。

(4) 向已铺好基质细胞层的孔中加入扩增前的细胞 5×10^3 个或扩增后的细胞 1×10^3 个，培养液可选择 MyeloCult H5100(Stem Cell Technologies)，并添加 10^{-6} mol/L 氢化可的松。每周半量换液。

(5) 培养 5 周后，用 0.25% 胰酶消化细胞，收集所有细胞洗涤 1 遍后，按上述集落培养方法进行造血细胞集落分析，第 14 天对所有集落进行计数，即为 LTC-IC。

7) 结果

纯化的 $CD34^+$细胞在体外扩增培养体系中培养 14 天后，细胞总数、$CD34^+$及 $CD34^+CD38^-$亚群均有不同程度的扩增。培养至第 8 周，成人骨髓来源的造血干/祖细胞可扩增 90~10 000 倍。扩增后的细胞具有很好的集落形成能力。培养至第 10 周时成人骨髓来源

的造血细胞的集落形成细胞总数扩增了50~5000倍。LTC-IC数量从培养第一周开始就有明显的增加，培养第4周的细胞的LTC-IC可扩增7.4倍，5周时扩增11.3倍。

4.1.3 造血干/祖细胞的体外分化

4.1.3.1 造血干/祖细胞向红系定向诱导分化

造血干/祖细胞具有极强的自我更新及向各系血细胞分化的能力。在体外要促使造血干/祖细胞向红系细胞分化，需要尽可能模拟体内的微环境。本实验室采用两阶段诱导的方法，获得了以晚幼红细胞为主的红系细胞。体外诱导分化的14~21天为细胞生长峰期，细胞总数可增加1028.6±228.4(n = 10)倍，红系的诱导效率可达(52.3±12.4)%。尽管实验表明造血干/祖细胞很容易分化为红系细胞，但在体外却很难实现分化细胞的成熟脱核。最近有研究结果显示，如果以减少扩增的细胞数为代价，也可能获得成熟的红细胞(Carlile et al. 2004)。而如何大规模的生产成熟的红细胞以满足临床输血需要这一问题就成了一个难题。Giarratana 等研究人员(2005)提出了一个改进的技术方法，即通过尽可能的模拟骨髓微环境(应用细胞因子及与基质细胞共培养)的方法实现了造血干祖细胞的持续扩增及100%的分化为成熟的红细胞。这种方法适用于骨髓、G-CSF动员的外周血、脐带血来源的造血干/祖细胞，也适用于胚胎干细胞分化的红系祖细胞(Carotta et al. 2004)。

4.1.3.1.1 材料和试剂

①成人骨髓基质细胞或小鼠基质细胞系；②IMDM；③氢化可的松；④造血生长因子SCF、IL-3、EPO等；⑤BSA；⑥转铁蛋白；⑦硫酸亚铁；⑧硝酸铁；⑨胰岛素；⑩PBS缓冲液；⑪FITC-CD71单克隆抗体；⑫核酸染料LDS-751；⑬台盼蓝染液；⑭吉姆萨染液；⑮离心管、吸管、培养板等。

4.1.3.1.2 $CD34^+$造血干/祖细胞的分离纯化

见本节第一部分。

4.1.3.1.3 $CD34^+$造血干/祖细胞向成熟的红细胞分化(分三阶段进行诱导分化)

1) 第一阶段(0~8天)

(1) 按10^4个/ml的密度接种$CD34^+$细胞于无血清培养液中，并添加10^{-6}mol/L氢化可的松，SCF 100ng/ml，IL-3 5ng/ml，EPO 3IU/ml。将细胞置于5% CO_2、饱和湿度的37℃孵育箱中培养。

无血清培养液：IMDM、1% BSA、转铁蛋白120μg/ml、硫酸亚铁900ng/ml、硝酸铁90 ng/ml、胰岛素10μg/ml。

(2) 培养至第4天，将上述培养的细胞按1∶4传代，培养条件不变。

2) 第二阶段(3天)

(1) 基质细胞的培养(见4.1.2.2中步骤“3)细胞培养”)。

(2) 将第一阶段培养的细胞按$5×10^4$个/ml、$2×10^5$个/ml、$3×10^5$个/ml的密度(分别来源于脐带血、骨髓、外周血)接种于预先铺有基质细胞层(MS-5或成人骨髓基质细胞)的培养瓶里，在含有3 IU/ml EPO的无血清培养液中继续培养3天。

3) 第三阶段(10 天)

经上一阶段的诱导分化后，去除细胞因子，添加无血清培养液，使造血细胞继续与基质细胞共培养 10 天。

4) 检测

(1) 对诱导分化不同天数的细胞进行吉姆萨染色，观察胞核形态变化；并利用台盼蓝染色计算出活细胞的比率。

(2) 细胞表面标志分析：

a. 收集分化不同天数的细胞，用 PBS 洗涤细胞。

b. 将 FITC-CD71 单克隆抗体或 FITC-IgG1 抗体(作为阴性对照)加入 PBS 悬浮的细胞中，冰上孵育 30min。

c. 用 PBS 洗涤细胞 3 次。

d. 用核酸染料 LDS-751 对细胞染色。

e. 用 PBS 洗涤细胞 3 次。

f. 将细胞重悬于 500μl PBS 中，用流式细胞仪检测。

(3) 血红蛋白分析，变形能力检测及体内实验验证等可参考文献报道(Giarratana et al. 2005)。

5) 结果

造血干细胞经细胞因子及基质细胞的共同诱导分化后，其细胞数量可扩增 1.95×10^6 倍，分化第 15~18 天，细胞核开始消失，细胞表面的转铁蛋白受体 CD71 逐渐丢失，造血干细胞 100%分化为成熟的有功能的红细胞。这些分化的红细胞具有天然红细胞的功能特点，如细胞膜变形能力、携氧能力等。

4.1.3.2 造血干/祖细胞向巨核细胞定向诱导分化

Sui 等(1999)的研究表明，$CD34^+$细胞可被分为两个细胞亚群：$IL\text{-}6R^+$和 $IL\text{-}6R^-$的细胞。$IL\text{-}6R^+$细胞能被刺激而形成粒-巨噬细胞、淋巴细胞和粒细胞；而 $IL\text{-}6R^-$细胞当被给予 IL-6/可溶性 IL-6 受体(sIL-6R)时则可形成红系及巨核系细胞，从而得出结论，即巨核系祖细胞存在于 $IL\text{-}6R^-$的细胞群中。我们实验室利用上述特点采用免疫磁珠两步分离法建立了一种巨核系祖细胞的分离方法。用该方法分离获得的细胞在体外加入 TPO、sIL-6R、SCF 等细胞因子组合培养 14 天后，CD41/CD61 双阳性细胞可达 60%以上(以往的方法为 30%左右)，大大增加了巨核细胞的诱导效率，为该方案的临床实施奠定了基础。

4.1.3.2.1 材料和试剂

①脐带血、外周血或骨髓；②MACS 磁性分离仪、分离柱；③MACS 磁性细胞分离试剂盒(Lin^- 细胞分选、$CD126^+$ 细胞分选)；④PBS 缓冲液；⑤甲基纤维素；⑥BSA；⑦EDTA；⑧淋巴细胞分离液；⑨IMDM；⑩SCF、TPO、IL-6、sIL-6R 等；⑪胰岛素；⑫转铁蛋白；⑬*β*-巯基乙醇；⑭*L*-谷氨酰胺；⑮叶酸；⑯维生素 B_{12}；⑰瑞氏染液；⑱PE-CD41、FITC-CD61 鼠抗人单克隆抗体；⑲离心管、吸管、培养板等。

4.1.3.2.2 Lin^-细胞的分离

参考“Lin^-CD34^-细胞与 Lin^-CD34^+细胞的分离”中的内容。

4.1.3.2.3 $Lin^-/CD126^-$细胞的分离

巨核系祖细胞的分离纯化，Backman Coulter 公司免疫磁珠分离系统。

(1) 取抗 CD126 抗体(抗 IL-6 受体的抗体)工作液 50μl 与 50μl 免疫磁珠混匀，4℃孵育 30min。

(2) 将分离的 Lin^- 细胞与上述混合物混匀，4℃孵育 30min。

(3) 将细胞与抗体的混合物置于 5ml 分离管内，充分混匀，置于 Backman Coulter 磁架上室温静置，直到磁珠贴于磁场一侧、试管内液体清亮为止。

(4) 在磁场内轻轻将液体吸出，其中的细胞为 $Lin^-/CD126^-$细胞。

(5) 贴于管壁的细胞即为 $Lin^-/CD126^+$细胞。

(6) 将收获的 $Lin^-/CD126^-$细胞加 PBS 缓冲液混匀,用于细胞计数及巨核细胞的定向诱导分化。

4.1.3.2.4 向巨核细胞定向诱导分化

1) 配制诱导分化液

诱导分化液：IMDM、SCF 100ng/ml、TPO 4U/ml、IL-6 100ng/ml、sIL-6R 200ng/ml、2% BSA、胰岛素 10μg/ml、转铁蛋白 200μg/ml、*β*-巯基乙醇 0.01mmol/L、*L*-谷氨酰胺 2mg/ml、叶酸 50ng/ml、维生素 B_{12} 50ng/ml。

2) 细胞接种

将分离得到的 $Lin^-/CD126^-$细胞按 2×10^4 个/ml 的浓度接种于 24 孔板中，在 37℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养 14 天。设 $Lin^-/CD126^+$细胞作为对照组。

3) 细胞收集及分析

每 3 天半量换液。第 7 天及第 14 天收集部分细胞用于细胞计数及巨核细胞表型分析。

4) 结果检测

(1) 细胞表面标志分析：

a. 先用 PBS 缓冲液对收集的细胞进行洗涤。

b. 将 PE-CD41，FITC-CD61 单克隆抗体加入 PBS 悬浮的细胞悬液中，以加入 PE-IgG1 及 FITC-IgG1 标记的抗体的细胞作为阴性对照。冰上孵育 30min。

c. 洗涤细胞，流式细胞仪检测。

(2) 细胞形态学分析：常规瑞氏染液染色，普通光学显微镜下观察并摄片。

5) 结果

对分离 Lin^-细胞前后的细胞进行计数，可统计出 Lin^-细胞占 MNC 的比率约为 $(0.66\pm0.33)\%(n=6)$。通过流式细胞仪分析，$IL\text{-}6R^-$细胞占 Lin^-细胞的 32%~43%。由此方法可从一份脐带血中分离出巨核系祖细胞(Lin^-CD126^-细胞)约$(8.32\pm2.17)\times10^5$ 个(该方法已申报国家发明专利，授权号：ZL01120150.9)。$Lin^-/CD126^-$细胞在 IL-6/ sIL-6R 等的作用下，使其细胞总数在培养的第 7 天可扩增 35.2±2.8 倍，培养至 14 天时可扩增 94.5±13.0 倍,流式细胞仪检测结果表明 $CD41a^+/CD61^+$细胞(巨核系细胞)比例可达 67%(图 4.1)。与 $Lin^-/CD126^+$ 细胞相比，无论在细胞扩增的倍数上，还是在 $CD41a^+/CD61^+$细胞所占的比例上，$Lin^-/CD126^-$细胞组均优于 $Lin^-/CD126^+$细胞组($P<0.05$)。形态学观察可见典型的巨核细胞(图 4.2)。

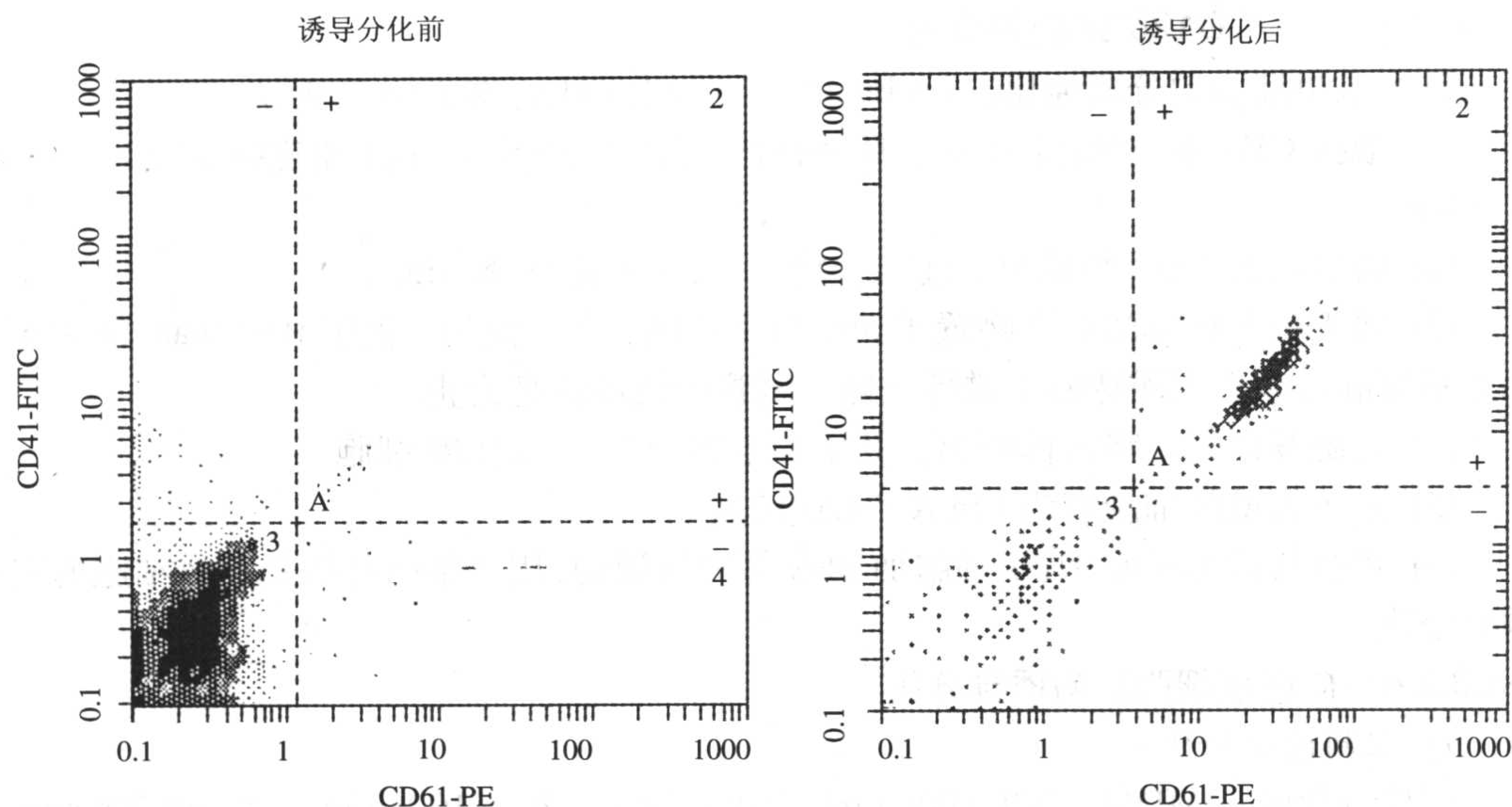
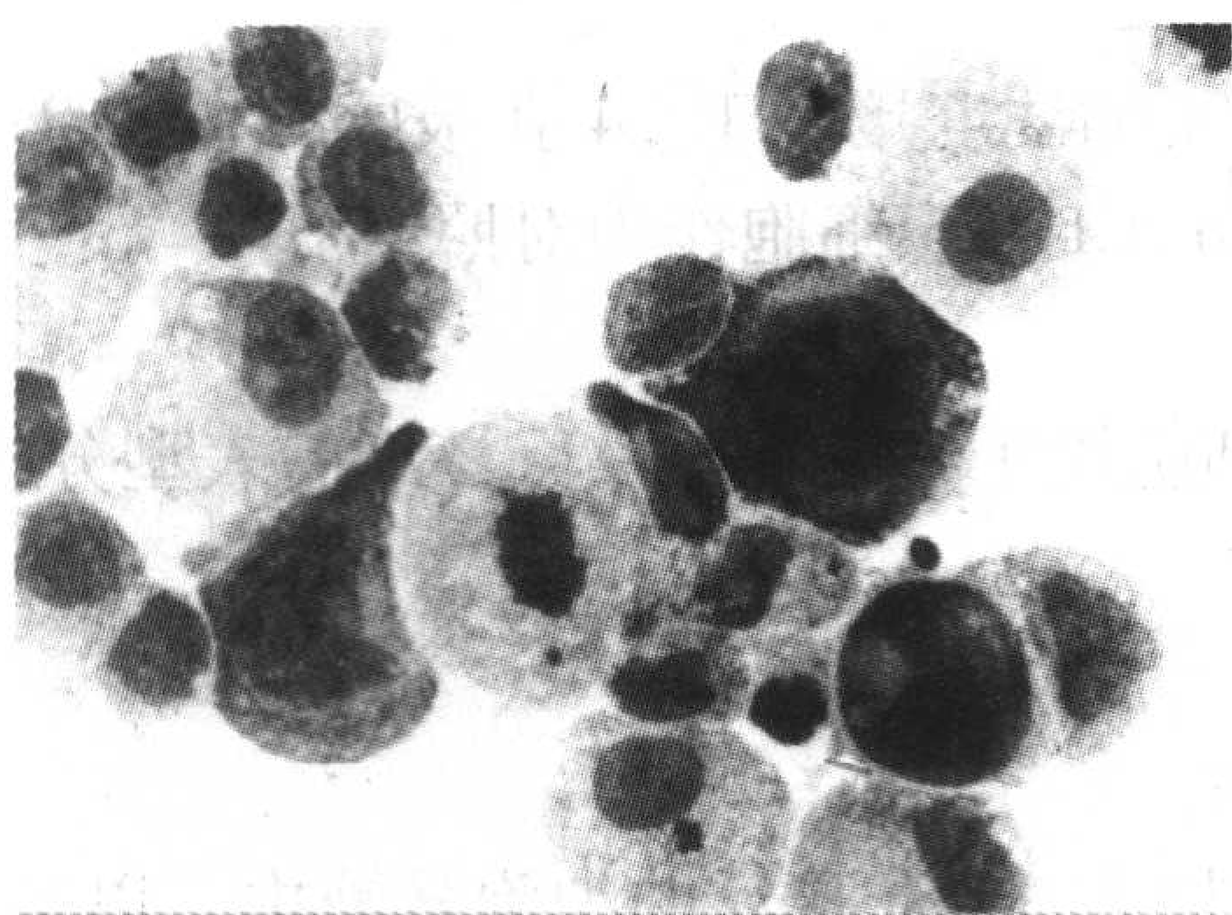


图 4.1　Lin⁻/CD126⁻细胞体外向巨核细胞定向诱导分化细胞表型的变化


图 4.2　诱导分化的巨核细胞的形态

4.1.3.3　造血干/祖细胞向粒系定向诱导分化

尝试诱导造血干/祖细胞向粒系细胞分化，不但可以为临床成分输血提供大量的粒细胞，还可以为对分化过程中的分子调控机制的进一步研究提供一个很好的模型。本实验室根据不同细胞因子的作用，摸索出利用SCF+IL-6+IL-3+G-CSF 的组合，可以诱导脐带血造血干/祖细胞向粒细胞分化，分化效率达 64%。出于临床应用的考虑，我们利用混合脐带血浆代替了常规造血细胞体外培养所应用的牛血清及马血清，获得了满意的结果，其意义在于一方面节约了应用成本，另一方面则避免了由于异种血清造成的免疫反应。

1) 材料和试剂

①IMDM；②胎牛血清、马血清；③SCF、IL-3、G-CSF、IL-6 等；④PE-CD11b、FITC-CD16 鼠抗人单克隆抗体；⑤大肠杆菌 JM109；⑥LB 培养基；⑦生理盐水；⑧甲醇；⑨台盼蓝；⑩瑞氏染液；⑪碱性美蓝液。

2) $CD34^+$ 造血干/祖细胞的分离纯化

参见本节第一部分。

3) 向粒系细胞定向诱导分化

(1) 将分离得到的造血干/祖细胞按 2×10^5 个/ml 的密度种入 24 孔板中，添加培养液：

IMDM 培养基含 15% 胎牛血清及 15% 马血清。培养体系中加入以下 4 种细胞因子：50ng/ml SCF、2ng/ml IL-3、40ng /ml G-CSF、20ng/ml IL-6。将细胞置于 37℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养。

(2) 每 2 天加细胞因子一次，每周半量换液。

(3) 经第一阶段培养 7 天后，细胞因子改为每 2 天只加一次 40ng/ml G-CSF。

(4) 每 2 天取样品对有核细胞进行计数，并利用台盼蓝染色计算出活细胞的比率。

(5) 检测。

a. 细胞表面标志分析：

i. 收集细胞，用 PBS 缓冲液洗涤细胞。

ii. 将 PE-CD11b，FITC-CD16 单克隆抗体加入 PBS 悬浮的细胞悬液中，以添加 PE-IgG1 及 FITC-IgG1 抗体的细胞作为阴性对照，冰上孵育 30min。

iii. 用 PBS 缓冲液洗涤细胞以去除未结合的抗体，重悬细胞后上流式细胞仪检测。

b. 细胞形态学分析：常规瑞氏染液染色，普通光学显微镜下观察并摄片。

c. 粒细胞吞噬细菌功能测定：

i. 将大肠杆菌 JM109 接种于 LB 培养基中，放 37℃摇床振荡培养 4h 左右。

ii. 将上述菌液置水浴中(100℃)加热 10min，目的是杀死细菌。

iii. 用无菌生理盐水稀释成 6×10^8 个/ml 备用。

iv. 取诱导分化的粒细胞按 1×10^8 个/ml 浓缩。

v. 取 50μl 细胞悬液，加入洁净凹玻片的凹孔内，轻轻搅动混匀，再加上述菌液 20μl 充分混匀。

vi. 置入铺有湿纱布的有盖容器内(此容器先放 37℃温箱中预温)，在 37℃温箱中作用 30min，其间每隔 10min 摇匀一次。

vii. 作用完毕，取 1 滴混合液置于洁净无油污的载玻片一端，推成薄片。

viii. 待干后，用甲醇固定 4~5min，碱性美蓝液染 2~3min，置油镜下观察。

ix. 随机计数 100 个中性粒细胞，分别记录发生吞噬和未吞噬的白细胞数，对有吞噬作用的白细胞，应同时记录所吞噬的细菌数，将 100 个中性粒细胞所吞噬的细菌总数除以 100，得到每个白细胞吞噬细菌的平均数，即为吞噬指数。

(6) 结果：本实验室的结果显示体外诱导分化的 14~21 天为细胞生长峰期，细胞总数可增加 1006.4±103.2(n = 10)倍，随着培养时间的延长，细胞数量不再增加而死细胞的比率开始增加，死细胞比率达到 20%的时间为 33.0±4.0 天(n = 10)。利用粒系的特异性表面标志 CD11b 进行流式细胞仪检测，结果表明粒系的诱导效率可达(64.7±10.3)%。显微镜下可见典型的粒系细胞，其中可见许多分叶核细胞(图 4.3)。诱导分化的细胞与大肠杆菌作用 30min 后，发生细菌吞噬的细胞为 35.0%，平均每个吞噬细菌的细胞内的细菌数为 5.0±3.0 个(图 4.4)。

4.1.3.4 造血干/祖细胞向树突细胞定向诱导分化

树突细胞(dendritic cell，DC)是功能最强的抗原呈递细胞，它在机体免疫应答过程中发挥了重要的作用。为获得大量纯化的树突细胞以满足临床需要，人们尝试从骨髓、脐

带血、脾脏、外周血等部位分离 $CD34^+$造血干细胞、单核细胞并将其定向诱导分化为具有较强免疫功能的树突细胞。

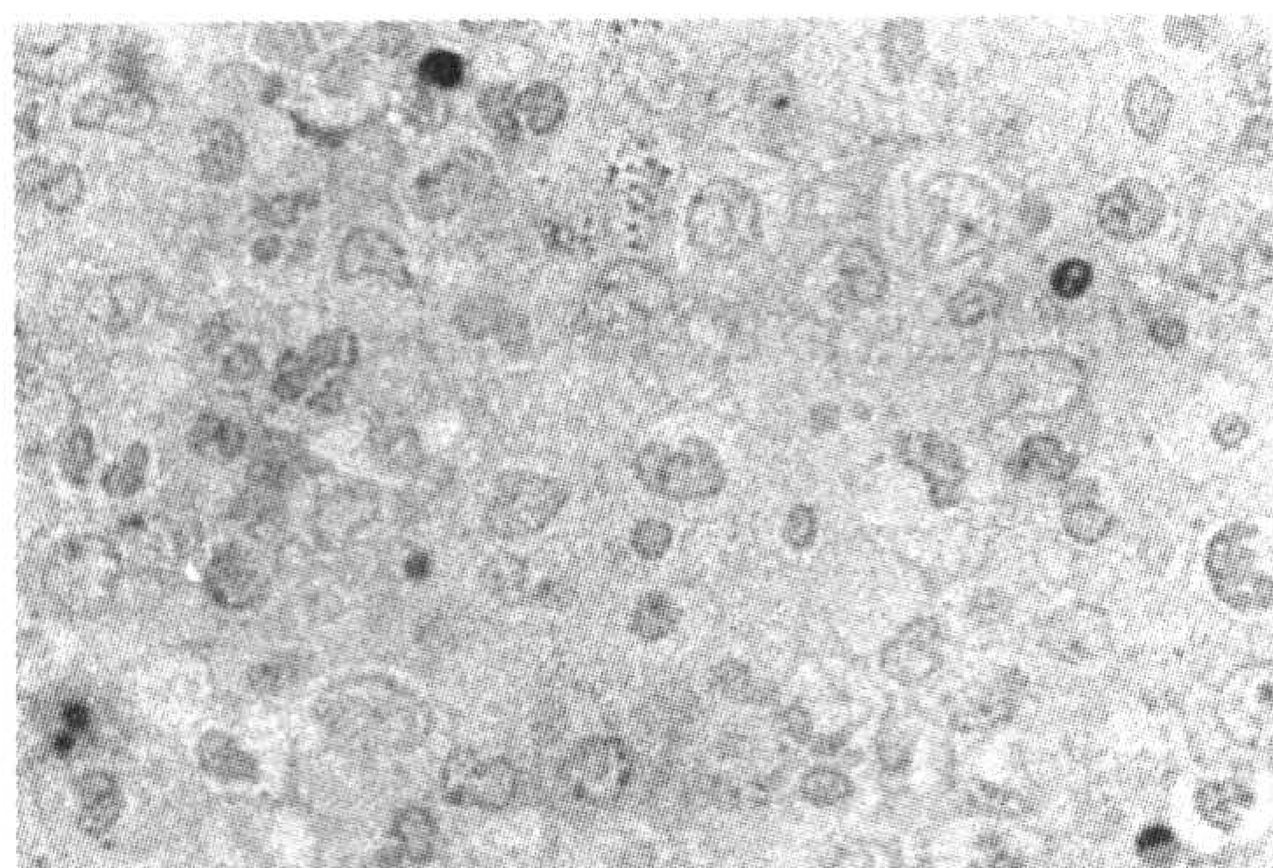


图 4.3 体外诱导分化的粒系细胞的形态

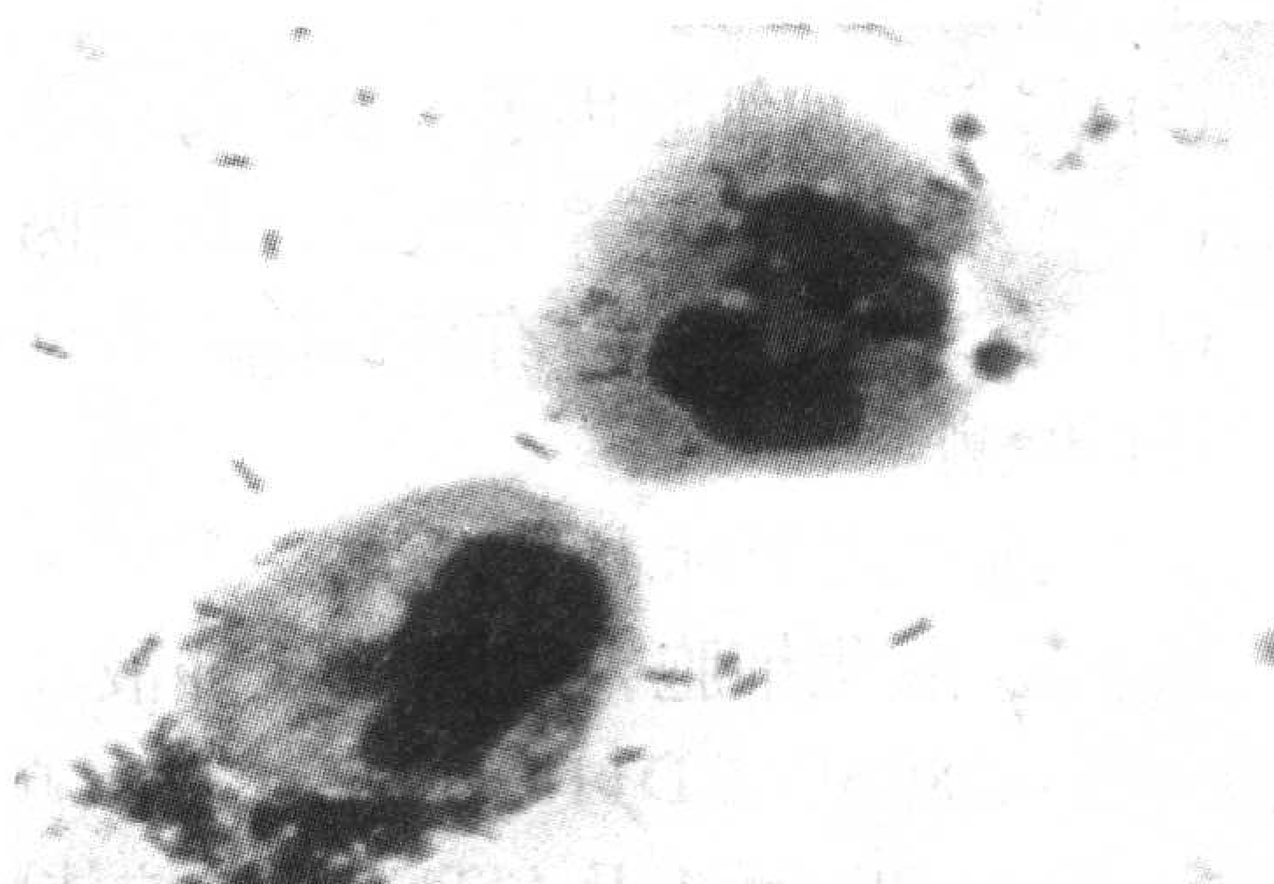


图 4.4 诱导分化的粒细胞吞噬细菌

1) 材料和试剂

①IMDM、R/MINI1640；②胎牛血清；③FL、GM-CSF、IL-4、TNF-α 等；④台盼蓝；⑤PE-CD1a、FITC-CD80(B7-1)及 PE- HLA-DR 鼠抗人单克隆抗体；⑥PBS；⑦外周血；⑧T 细胞尼龙毛柱；⑨淋巴细胞分离液；⑩丝裂霉素 C；⑪ [^{3}H]-TdR；⑫液闪计数仪；⑬离心管、吸管、培养板等。

2) $CD34^+$造血干/祖细胞的分离纯化

参见本节第一部分。

3) 向树突细胞定向诱导分化

(1) 将分离得到的造血干/祖细胞按 2×10^4 个/ml 的密度种入 24 孔板中，添加基础培养液：IMDM 培养基含 10%胎牛血清。添加 4 种细胞因子：40ng/ml FL、40ng/ml GM-CSF、1000U/ml IL-4、50U/ml TNF-α。将细胞置于 37℃、体积分数为 5%CO_2 的空气条件下培养 2 周。

(2) 每 2 天添加各种细胞因子一次，并取样品对有核细胞进行计数，利用台盼蓝染色计算出活细胞的比率。

(3) 检测。

a. 细胞表面标志分析：

i. 收获诱导前后的细胞，用 PBS 洗涤。

ii. 向细胞悬液中分别加入 PE-CD1a、FITC-CD80(B7-1)及 PE-HLA-DR 鼠抗人单克隆抗体，以添加 PE-IgG1 及 FITC-IgG1 抗体的细胞作为阴性对照，4℃，孵育 20~25min。

iii. PBS 洗涤 3 次，重新悬浮，用流式细胞仪检测。

b. 同种异体 T 淋巴细胞增殖反应：

i. 取健康志愿者的外周血 10ml，经淋巴细胞分离液密度梯度离心后收集单个核细胞(具体步骤参考本节第一部分)。

ii. 将获得的 MNC 置 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养 2h。

iii. 去除贴壁细胞，非贴壁细胞用含 5%胎牛血清的 RPMI1640 悬浮，注入 T 细胞尼龙毛柱中，37℃孵育 1h。

iv. 冲洗出非黏附细胞，用作同种异体 T 细胞，调整密度种入 96 孔板中(1×10^5 个/孔)。

v. 将诱导 14 天的树突细胞与 30μg/ml 丝裂霉素 C 共孵育 30min。

vi. PBS 缓冲液洗 3 次。

vii. 用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液悬浮诱导分化的树突细胞，调整密度后，加入预先种有 T 淋巴细胞(1×10^5 个/孔)的 96 孔板中，使效靶比分别为 1∶1000，1∶100，1∶10，均设 3 个复孔，终体积为 200μl/孔。

viii. 置 37℃、5% CO_2 的培养箱中共培养 96h。

ix. 于培养结束前 16h 加入 0.5 μCi/孔(1Ci = 3.7×10^{10}Bq)的[^{3}H]-TdR。

x. 收集细胞，液闪计数仪检测 cpm 值，结果用 3 孔均值表示。

(4) 结果：DC 表达 CD1a 抗原。本室的研究结果表明在 FL、GM-CSF、TNF-α 及 IL-4 等细胞因子的诱导下，脐血 $CD34^+$ 细胞可分化形成大量的 DC($CD1a^+$)。诱导培养 2 周后，可使 $CD1a^+$细胞的比例增至(27.18±1.56)%，且培养细胞中可见大量的 DC(图 4.5)，其中 GM-CSF 和 TNF-α及 IL-4 是诱导生成 DC 的基本的细胞因子，SCF 和 FL 对诱导 $CD34^+$ 细胞生成 DC 具有明显的协同作用。扩增后的细胞中 $CD1a^+$、$CD80^+$(B7-1)及 $HLA\text{-}DR^+$细胞的比例分别由扩增前的(0.65±0.38)%、(0.36±0.25)%及(2.39±0.27)%增加至诱导分化后的(27.18±1.56)%、(22.26±2.23)%及(87.68±3.81)%。诱导分化的树突细胞对刺激同种异体 T 细胞增殖具有很强的功能。

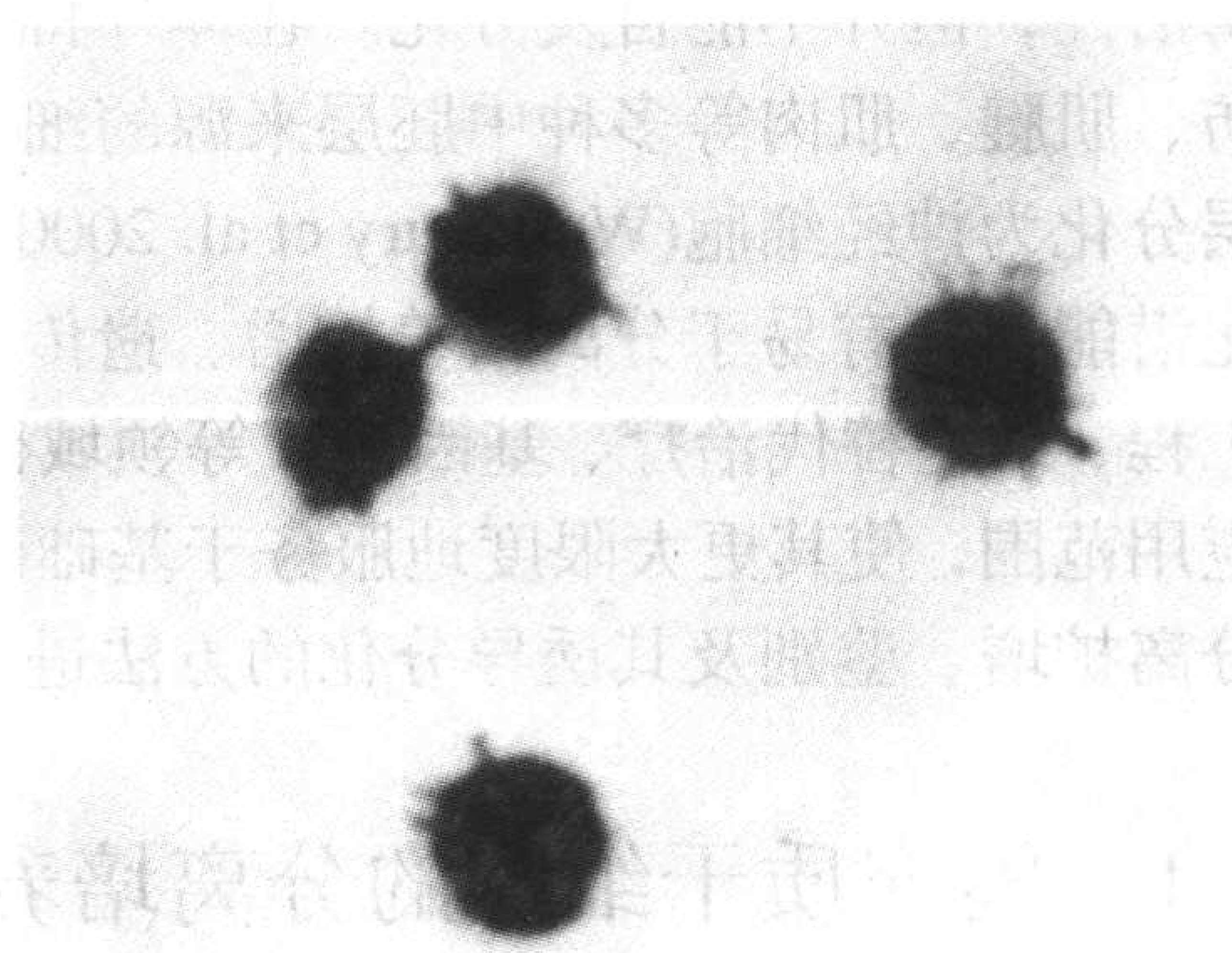


图 4.5　脐血 $CD34^+$ 细胞定向诱导生成的 DC 形态

(李艳华　裴雪涛)

4.2 间充质干细胞

间充质干细胞(mesenchymal stem cell，MSC)最早发现于骨髓中。1867 年，德国科学家 Cohnheim 在研究创伤愈合时，提出了骨髓中存在非造血干细胞的观点。1976 年，Friedenstein 和他的同事以确凿的证据表明，骨髓中除含有造血干细胞外，还含有梭形的集落形成成纤维祖细胞或成纤维集落形成单位(fibroblast colony-forming unit，CFU-F)，这些细胞在体内处于休眠状态，而在体外适当条件的刺激下可以进入细胞周期，从而形成类似于骨或软骨碎片的细胞集落。在此基础上，Friedenstein 等于 1987 年又发现在塑料培养皿中培养的贴壁的骨髓单个核细胞在一定条件下可分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞和成肌细胞，而且这些细胞扩增 20~30 代后仍能保持其多向分化潜能，这类细胞被称为骨髓间充质干细胞。

一般认为，体外培养的 MSC 细胞体积小，呈梭形，核浆比大。人体骨髓中 MSC 的含量极其稀少，仅占单个核细胞的 10^{-6}~10^{-5}，因此对其进行分离纯化和扩增就显得尤为重要。分离 MSC 的方法主要有三种：①全骨髓贴壁培养法；②密度梯度离心法；③根据 MSC 表面标志，利用流式细胞仪进行分选。研究发现 MSC 不表达如 I、II、III 型胶原、碱性磷酸酶或骨桥蛋白(osteopontin)等与分化相关的细胞标志；也不表达脂多糖受体 CD14、CD34、白细胞表面抗原 CD45、vW 因子和 HLA-DR 等造血干细胞的表面标志；但表达 SH2、SH3、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD120a、CD124、CD166 和多种表面蛋白，因此 MSC 缺乏特异的表面标志，不宜用流式细胞仪进行分选。根据其贴壁生长的特点，目前主要采用密度梯度离心法与贴壁培养法联合分离 MSC。

MSC 连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能，而且可保持正常的核型和端粒酶活性，但并不能自发分化。在体外特定的诱导条件下，MSC 可以分化为骨、软骨、脂肪、肌腱、肌肉等多种中胚层来源的细胞(Pittenger et al. 1999)，不仅如此，它还可跨胚层分化为神经细胞(Woodbury et al. 2000)、胰岛细胞等。正是由于 MSC 的这种强大的分化潜能及具有易于分离培养扩增、遗传背景稳定、体内植入反应较弱等特性使其在组织工程、细胞替代治疗、基因治疗等领域得到了日益广泛的应用。为了进一步拓展 MSC 的应用范围，使其更大限度地服务于基础研究与临床医学，本节将对不同来源的人 MSC 的分离扩增、鉴别及其诱导分化的方法进行系统的介绍。

4.2.1 间充质干细胞的分离培养与扩增

研究表明，除骨髓外，在外周血、脐血、脂肪、关节滑膜以及骨骼肌和皮肤的结缔组织等多种组织中均发现有 MSC 的存在。骨髓中 MSC 的含量很低，一般为 0.001%~0.01%，要利用 MSC 就必须实现其在体外的分离培养及扩增。目前，分离培养方法主要有贴壁筛选法、密度梯度离心法、流式细胞仪分选法。下面分别介绍几种适用于不同来源的人的 MSC 的分离纯化及扩增方法。

4.2.1.1 骨髓来源 MSC 的分离、纯化和扩增培养

1) 材料与试剂

骨髓、低糖 DMEM(DMEM-LG)、Percoll 分离液、10×PBS、1×PBS、MesenCult™ 培养液、肝素。

2) 方法

(1) 无菌条件下采集健康志愿者骨髓，肝素抗凝。

(2) 用含 10%胎牛血清的 DMEM-LG 培养液适当稀释样品，1500r/min 离心 5min，弃上清及脂肪层。

(3) 加入 5ml 含 10%胎牛血清的 DMEM-LG 培养液，混匀。

(4) 按照 1∶1 的比例将上述细胞悬液缓慢滴加到密度为 1.073g/ml 的 Percoll 分离液中，1500r/min 离心 30min。离心后管内容物分为 3 层。上层为血小板，中间层为 Percoll 分离液，底层为红细胞和多核白细胞。在上、中层液体界面处可见到乳白色云雾状的单个核细胞层。

1.073g/ml Percoll 分离液配制方法：5.4ml Percoll 原液、6ml 10×PBS。二者混匀后，吸弃 300μl 混合液。然后用 1×PBS 补齐至 10ml，即为 1.073g/ml Percoll 分离液。

(5) 吸取云雾状单个核细胞层，加入培养液稀释混匀，离心洗涤 2 遍。

(6) 用 MesenCult™ 培养液(Stem Cell Co.)重悬细胞，以 2.0×10^5 个/cm^2 的细胞密度接种于培养瓶中，置于 37℃、5% CO_2、饱和湿度的孵箱内培养。

(7) 48h 后弃掉未贴壁细胞，更换新鲜培养液。

(8) 以后每 3 天换液一次。

(9) 细胞长到 80%融合时，用 0.25%的胰蛋白酶消化。

(10) 按 8×10^3 个/cm^2 的细胞密度传代进行扩增培养。

3) 结果

用 Percoll 液(1.073g/ml)梯度离心从骨髓中分离单个核细胞，接种于 MesenCult™ 培养液中，72h 后出现散在的纺锤状贴壁细胞，10~14 天后形成克隆，MSC 贴壁稀疏时，长梭形细胞的两极朝向不规律，细胞排列混乱，细胞之间往往通过突起相连接。约 3 周出现致密的贴壁细胞层，此时细胞的两极开始有规律地排列成束状(图 4.6)，有的呈漩涡状。每瓶单层融合的 MSC 用胰蛋白酶消化后平均获得$(5.5\pm0.17)\times10^5$ 个细胞，将这些细胞再传代培养，扩增 12 代后可获得 2.3×10^9 个细胞，扩增约 4.6×10^4 倍。

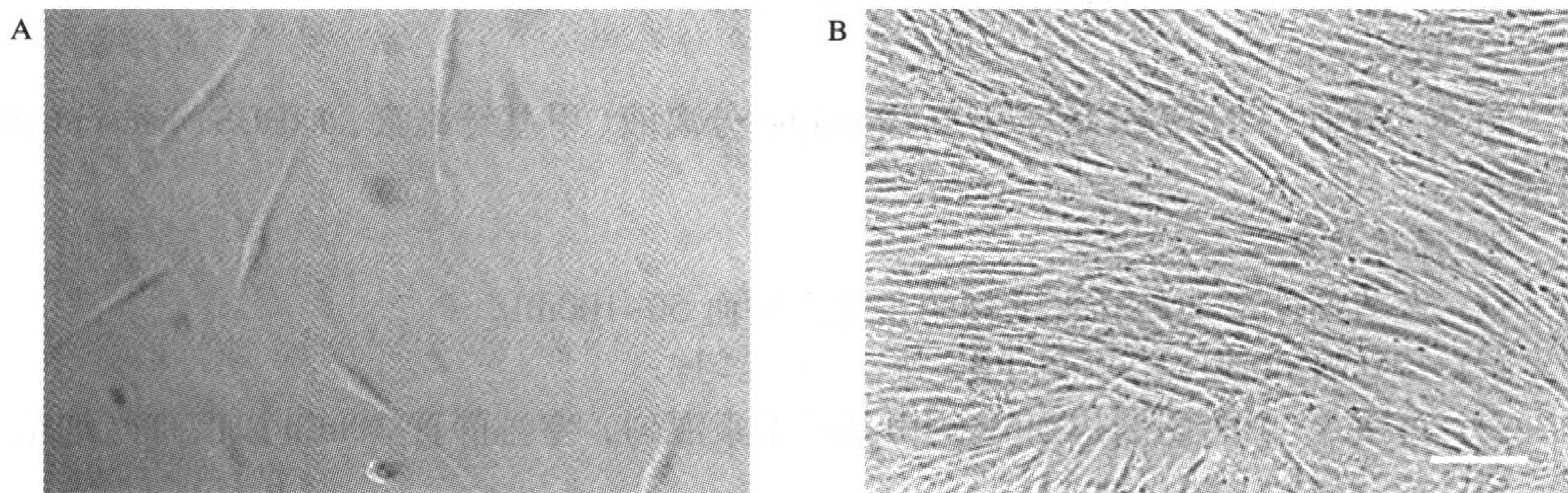


图 4.6　原代培养 72hMSC 的形态(A)(100×)和生长 3 周的 MSC 的形态(B)(100×)

4) 注意事项

(1) 在原代培养物中，除了呈成纤维细胞样的 MSC 外，还混杂着一些巨噬细胞、单核细胞、造血细胞及红细胞等，要得到较均一的 MSC，必须除去其他细胞。根据这些污染细胞的特性，可采用不同的方式排除它们。对于红细胞，因其不贴壁，可通过换液除去；对于贴壁细胞，可根据其黏附能力与 MSC 黏附能力的不同，通过调整胰蛋白酶-EDTA 的消化时间，保证 MSC 在短暂的时间内与培养皿底分离，而巨噬细胞、单核细胞、造血细胞等仍贴附于培养皿底，从而使 MSC 得到纯化。

(2) 选择合适贴壁时间的细胞。如果选用贴壁时间过早的细胞(1~3h)，则因贴壁细胞数量太少，使细胞生长困难；如果选用贴壁时间过长的细胞(超过 48h)，在倒置显微镜下可见大量造血细胞黏附在贴壁细胞上呈集落生长，随着培养时间的延长，会出现贴壁细胞形态多样性，细胞传代周期延长，细胞易老化等现象。

(3) 筛选最适于 MSC 生长的血清。首先血清的质量对于 MSC 的生长非常重要，一

定要对不同批次的血清进行比较，筛选出最适合 MSC 生长的一个批次。本实验介绍的 MesenCult™ 培养基即是选用了经过筛选的适于 MSC 增殖的胎牛血清而配制的，通过传代培养后 MSC 的纯度可高达 95%以上(一代和二代扩增培养后的 MSC 的表型一致性分别达到 95%和 98%)。其次，血清的浓度也很重要，并非浓度越高越好，反而高浓度血清由于含有大量促进细胞分化的因子，易引起细胞分化，从而使细胞过早出现老化，反而不利于干细胞生长，一般以 5%~10%胎牛血清最适合 MSC 生长。

(4) 选择合适的接种密度。细胞接种密度过密，会引起细胞之间的接触抑制；而过稀又会导致细胞分泌的因子不足从而影响细胞的生长。一般适宜密度为$(4\sim8)\times10^4$ 个/ml(艾国平等 2001)。

4.2.1.2 脐带血来源的 MSC 的分离、纯化和扩增培养

脐血干细胞由于取材方便、来源广泛而备受关注。研究表明，来源于脐带血的单个核细胞培养后出现的贴壁细胞有两种表型，破骨样细胞和间充质样细胞(Lingling et al. 2003)。破骨样细胞多核，表达 TRAP、CD45、CD51/CD61；间充质样细胞呈成纤维样，表达 SH2、SH3、SH4、ASMA、MAB1470、CD13、CD29、CD49e，这与骨髓 MSC 完全一致。以下就将脐带血 MSC 的体外分离、纯化、扩增方法做一介绍，为脐带血 MSC 的临床应用提供更充足的理论依据和技术方法。

1) 材料与试剂

肝素、脐血、DMEM-LG、Ficoll-Hypaque 分离液、甲基纤维素、1×PBS、MesenCult™ 培养液。

2) 操作步骤

(1) 无菌条件下采集肝素抗凝的正常人脐血 50~100ml。

(2) 与 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 按 1：1 混匀。

(3) 再按 4：1 的比例与 0.5%的甲基纤维素混匀，室温静置 30min 以沉降红细胞。

(4) 小心吸取上清，离心。

(5) 弃上清，用 PBS 重悬细胞。

(6) 叠加到密度为 1.077g/ml 的 Ficoll-Hypaque 溶液上，900*g* 离心 20min。

(7) 取界面层，加入 PBS 混匀，离心洗涤。

(8) 用 MesenCult™ 培养液(Stem Cell Co.)重悬细胞，以 1.0×10^6 个/cm^2 的密度接种于培养瓶中，置于 37℃、CO_2 5%、饱和湿度的孵箱内培养。

(9) 1 周后，更换培养基，弃掉未贴壁细胞。

(10) 以后每 3 天换液 1 次。

(11) 细胞长到 80%融合时用 0.25%的胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合液消化传代，在显微镜下控制消化时间。

(12) 以 8.0×10^3 个/cm^2 的细胞密度接种于传代培养瓶中以扩增培养。

3) 结果

以 Ficoll-Hypaque 液梯度离心分离脐带血单个核细胞，接种于 MesenCult™ 培养液中，一周后全量换液，去除未贴壁细胞。有的脐带血样单个核细胞培养后出现破骨样细胞，有的脐带血样单个核细胞培养后出现间充质样细胞。破骨样细胞胞体较大，呈圆形，

内含多个核(图 4.7A)。间充质样细胞即为 MSC，胞体呈梭形，最初散在存在，两周后形成包含有几十到几百个细胞的克隆，随着细胞的迅速增殖，3 周后细胞生长达 80%~90% 融合，每个克隆约包含几百至几千个细胞，此时的 MSC 呈较均一的长梭形，形态类似于骨髓 MSC，但较骨髓 MSC 稍小(图 4.7B)。据统计，6.6×10^5 个脐带血原代 MSC 在体外扩增 10 代后可获得 9.9×10^8 个细胞，扩增约 1.5×10^3 倍。

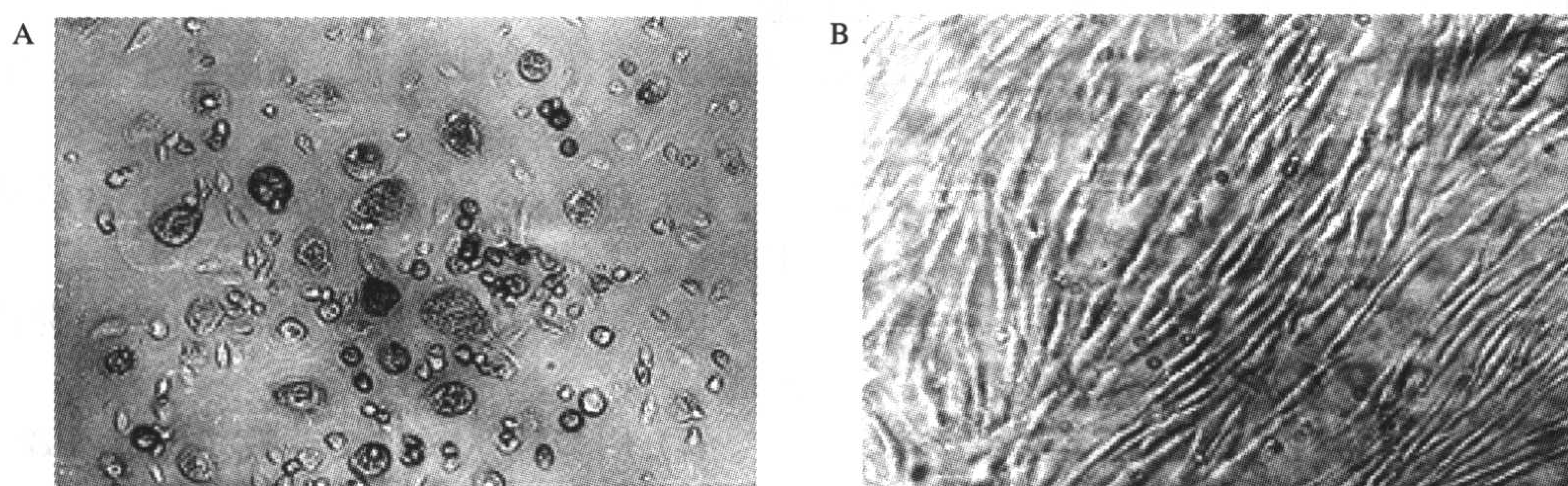


图 4.7　生长 2 周的破骨样细胞(A)(100×)和生长 3 周的原代 MSC 形态(B)(100×)

4) 注意事项

(1) 当前用于实验和临床的种子细胞主要为来源于骨髓的 MSC，但其数量随着年龄的增长而明显下降。脐血源性 MSC 的优势在于：脐血从分娩后的胎盘、脐带残端收集，其过程比从骨髓或胚胎获取干细胞简单；对于新生儿及产妇均无任何痛苦和不良作用，易于接受；脐血受胎盘屏障的保护，其成分被病毒、细菌污染的概率低；由于脐血免疫系统的原始性，降低了移植后受体的排斥反应；脐血中含有的丰富干细胞，与人骨髓中数目相当，且更为原始，具有更强的分化能力；不涉及社会、伦理及法律方向的更多争论；收集的脐血不仅可作为异基因移植的供体，而且还可将其低温保存数十年，用于自体移植治疗相关疾病。

(2) 与骨髓 MSC 相比，目前脐血来源的 MSC 仍存在数量少、频度低等问题。据统计约有 1/4 的脐带血样单个核细胞培养后出现 MSC，3/4 的脐带血样单个核细胞培养后出现破骨样细胞。因此，在体外培养过程中，如何消除破骨样细胞的存在，如何更好的对其进行纯化扩增，以获得稳定、均一的 MSC 仍是今后需努力探索的方向。

4.2.1.3　脂肪来源 MSC 的分离、纯化和扩增培养

近年来研究发现，脂肪组织中含有能分化为脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞的前体细胞群，具有较强的增殖能力和多分化潜能，可称之为脂肪基质细胞或脂肪间充质干细胞(Patricia et al. 2001)。

1) 材料与试剂

手术器械(大剪 1 把、止血钳 2 把、镊子 2 把、眼科镊子 1 把、眼科剪 1 把)，筛网(80 目、200 目、400 目)，平皿 2 个，50ml 离心管 2 个，10ml 离心管 2 个。

DMEM-LG，PBS，双抗，10% FBS，2% BSA，0.1%胶原酶，红细胞裂解液(0.154 mol/L NH_4Cl、10mmol/L · $KHCO_3$、0.1mmol/L EDTA)。

2) 方法

(1) 将切取的人的脂肪组织放入平皿中，游离血管，用 PBS 冲洗，剪碎，加入 4 倍体积胶原酶、1 倍体积 BSA 和双抗。

(2) 置入 50ml 离心管，37℃消化 45min，并不时摇动。

(3) 将消化成糊状组织的脂肪组织先用 80 目筛网过滤，后用 200 目再过滤一遍，余下的脂肪组织加入胶原酶继续消化，重复上述操作。

(4) 过滤液 800*g* 离心 10min，去除上清，加入少许含血清培养液，用吸管轻轻吹打，使之成悬液。

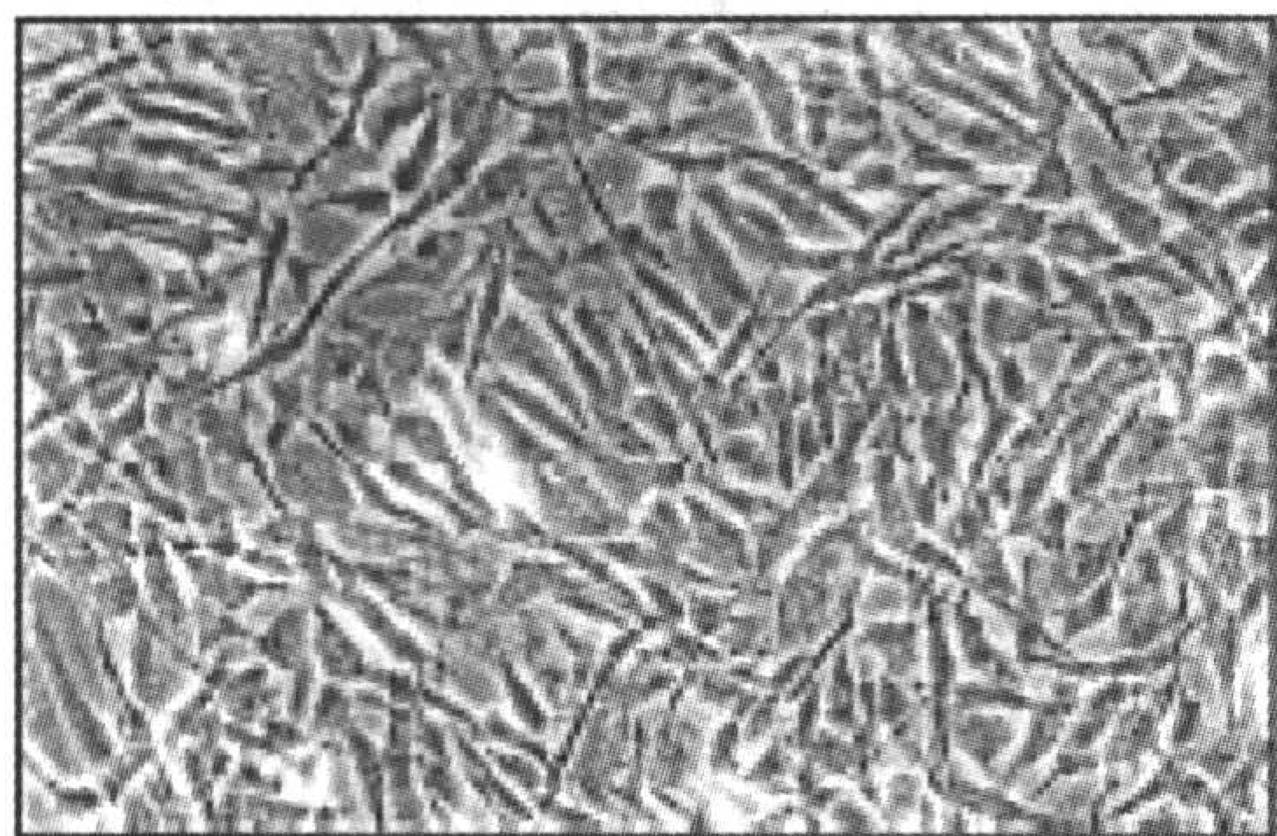


图 4.8 人脂肪来源的 MSC 的形态
(Patricia et al. 2001)

(5) 加入红细胞裂解液，室温放置 10min。

(6) 1200r/min 离心 5min，PBS 洗涤 2 遍。

(7) 用 DMEM-LG 培养液(含 10% FBS，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素)重悬细胞，接种于培养瓶中，置于 37℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱中培养。

(8) 24 h 后更换培养液。

3) 结果

体外培养的脂肪来源的 MSC 易扩增，并呈现成纤维细胞样形态，这与骨髓来源的 MSC 一致(图 4.8)。

4.2.1.4 MAPC 的分离培养

2002 年，Jiang 等从骨髓中分离纯化了一种更为原始的干细胞，称为多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cell，MAPC)(Yuehua et al. 2002，Yukari et al. 2003)。研究表明，MAPC 具有胚胎干细胞的某些特征，不仅可在体内、外分化成包括 3 个胚层来源的几乎所有组织的细胞，而且具有极强的增殖能力，体外培养扩增后至少可传 30 代以上。其表面标志为：$CD13^+$、$CD44^-$、$CD45^-$、c-kit^-、Flk-1^{dim} 和 MHC-I^-、MHC-$IIclass^-$。

1) 材料与试剂

(1) MACS 磁珠分选系统。

(2) 扩增培养基组成：60% DMEM-LG；40% MCDB-201；1×胰岛素-转铁蛋白-硒；1×油酸-牛血清白蛋白；10^{-8}mol/L 地塞米松；10^{-4}mol/L 抗坏血酸 2-磷酸盐；10ng/ml PDGF-BB；10ng/ml EGF；2%胎牛血清。

2) 方法

(1) 取健康人骨髓，用 1.077g/ml 的 Ficoll-Hypaque 分离液分离获得单个核细胞。

(2) 以 1×10^5 个/cm^2 的密度接种于纤维结合素包被的培养皿底部，加入上述扩增培养基。

(3) 24h 后，去除未贴壁细胞。

(4) 细胞长到 80%融合后，以 5×10^3 个/cm^2 的密度进行扩增培养。

(5) 继续培养 2~3 周。

(6) 收获细胞，利用 MACS 磁珠分选去除 $CD45^+$/$GlyA^+$阳性细胞。

(7) 然后将洗脱的细胞以 10 个/孔的密度接种于纤维结合素包被的 96 孔板中培养，细胞密度维持在$(0.5\sim1.5)\times10^3$ 个/cm^2。

3) 结果检测

人骨髓来源的 MAPC 形态呈多角形(图 4.9)，细胞胞质少，胞核周围有颗粒。其倍增时间为 48~60h。

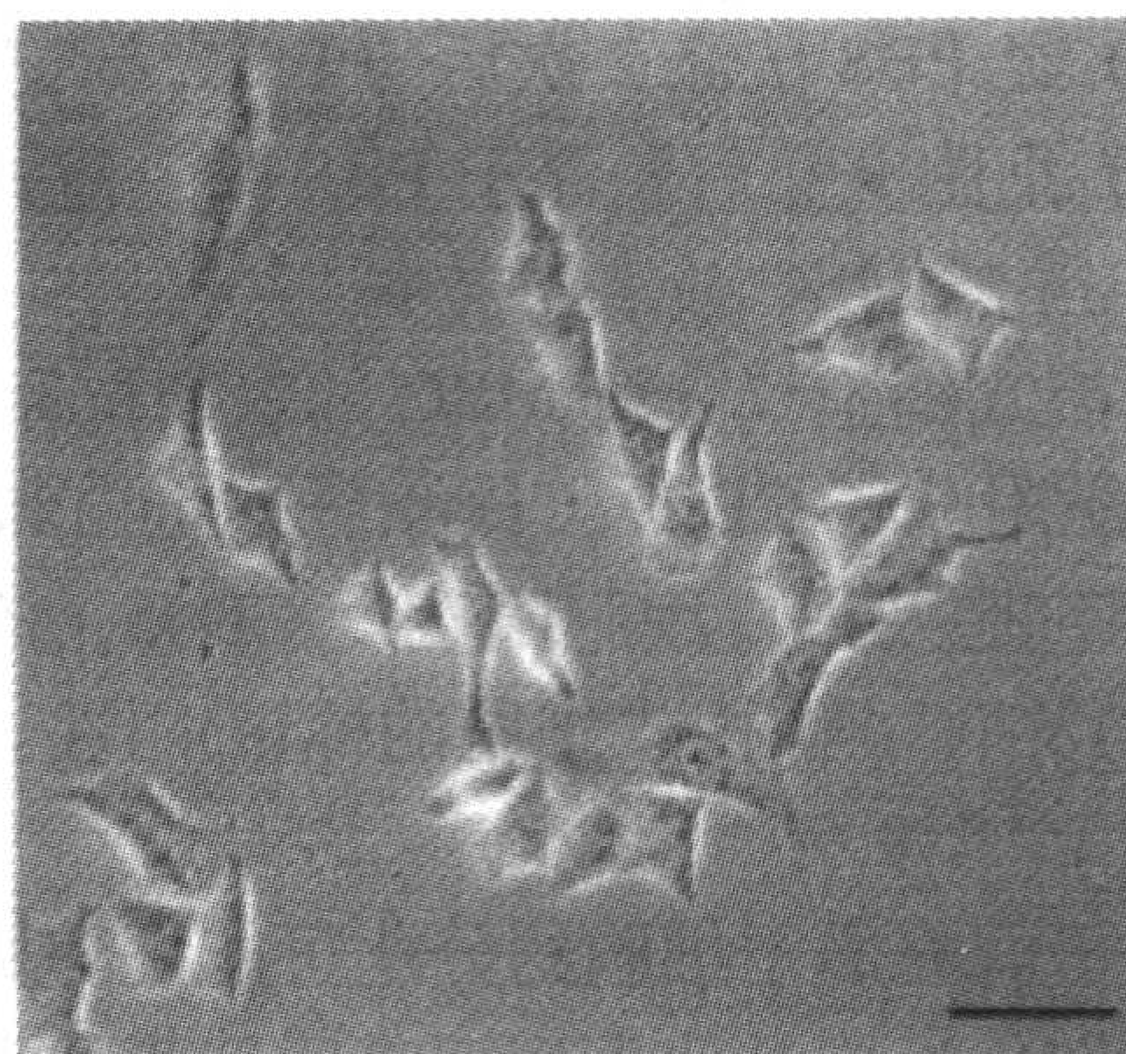


图 4.9 人骨髓来源 MAPC 的形态
(标尺：50μm)

4) 注意事项

(1) MAPC 培养与培养条件、细胞密度、CO_2浓度、培养基 pH、胎牛血清及培养皿的类型等均有关。

(2) 由于高密度下 MAPC 易分化，因此不同种属来源的 MAPC 的细胞种植密度不同：小鼠和大鼠 MAPC 最适密度为 500~1000 个/cm^2，人 MAPC 最适密度为 1500~3000 个/cm^2。

4.2.2 MSC 的鉴定

与 HSC 不同，MSC 具有多种标志，具有非单一性的特点。因此目前对 MSC 主要是通过将其形态学特征、多种表面标志及其具有的向骨、软骨、脂肪及神经等多种方向的分化功能这多方面相结合来进行鉴定的。

4.2.2.1 形态学鉴定

见本节间充质干细胞的分离培养与扩增结果检测部分。

4.2.2.2 表型鉴定

由于各个研究小组在标本的来源、分离的方法、检测细胞的代次以及培养条件等方面存在差异，因而检测到的 MSC 标志物之间也存在较大差异。但多数研究显示，MSC 是一群均质细胞，不表达造血细胞、成纤维细胞及内皮细胞抗原。

1) 方法

(1) 取传代扩增后的 MSC，用 0.25%的胰蛋白酶消化。

(2) 收获 1.5×10^6 个 MSC 细胞，分成每个 Ep 管(1.5ml)5×10^5 个 MSC 细胞，洗涤后重悬于 PBS。

(3) 分别加入抗 CD29、CD34、CD44、CD45、CD92、CD166 和 HLA2DR 单克隆

抗体，室温孵育 30min。同时设立阴性对照。

(4) 经 PBS 洗涤 2 次后与 FITC 标记的二抗避光反应 15min。

(5) 细胞洗涤后悬浮于 PBS 中，流式细胞仪检测。

2) 骨髓 MSC 的表型特征

用流式细胞仪分析 MSC 的表面抗原，结果显示，MSC 均一地表达 CD166(间质细胞阳性)；黏附分子 CD29、CD44(纤连蛋白和透明质酸盐的受体、基质细胞阳性)；而 CD34(造血干/祖细胞及内皮细胞阳性)、CD45(白细胞阳性)、HLA2DR(抗原呈递细胞及激活 T 细胞阳性)及荆豆素(内皮细胞的标记)阴性。

3) 注意事项

由于间充质干细胞的分化可能是随机非方向性的，因此已经分化的间充质干细胞依然具有转化生成其他类型间充质细胞的潜能。再者，个体不同发育阶段的间充质干细胞的表型功能特异性方面存在差异，上述可能是造成对间充质干细胞细胞表型特征存在争议的原因。因此，到目前为止，对于 MSC 鉴别并没有特异的分子标记，在这些方面还有待于进一步深入研究。

4.2.2.3 功能鉴定

在体外特定的诱导条件下，MSC 可以分化为骨(AKP、钙沉积或骨桥蛋白染色)、软骨(II 型胶原、酸性蛋白聚糖染色)、脂肪(亲脂性染料 Nile red 或 Oil red 染色)、肌腱、肌肉、神经、基质、肝和内皮等多种细胞。而形态与 MSC 相似的体外培养的皮肤成纤维细胞则不具有类似的分化潜能。因此我们可根据 MSC 特有的分化潜能对其进行鉴定。具体过程见下述 MSC 的诱导分化。

4.2.3 MSC 的定向诱导分化

骨髓 MSC 除了参与构成造血微环境，还具有广泛的分化潜能。大量的体内外实验证明，MSC 不仅可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞等间质组织外，还可跨越胚层界限，分化为外胚层的神经细胞及内胚层的肝脏细胞等。

4.2.3.1 MSC 向骨细胞的诱导分化

4.2.3.1.1 材料与试剂

DMEM-LG、FBS、10^{-7}mol/L 地塞米松、10mmol/L β-甘油磷酸钠和 50μg/ml 维生素 C。

4.2.3.1.2 诱导步骤

(1) 取传代 MSC，用胰酶消化成单细胞悬液。

(2) 以 8.0×10^{3} 个/cm^{2} 细胞浓度接种于预先置有盖玻片的 6 孔板内以制备细胞爬片。

(3) 每孔加入 DMEM-LG 培养液，置培养箱中，隔天换液 1 次。

(4) 待细胞融合达 80%，吸去孔内培养液。

(5) 实验组每孔加入成骨细胞诱导液(含 10^{-7}mol/L 地塞米松、10mmol/L β-甘油磷酸钠和 50μg/ml 维生素 C)2ml，对照组每孔加入等量 DMEM-LG 培养液，置培养箱中。

(6) 每 3~4 天换液 1 次。

(7) 镜下观察细胞形态的变化和生长情况。

4.2.3.1.3 骨细胞的鉴定

1) 试剂配制

(1) 10%福尔马林固定液的配制

37%~40%甲醛	10ml
蒸馏水	90ml

(2) 甲醛-钙固定液的配制

40% 甲醛液	10ml
氯化钙	2g
蒸馏水	90ml

(3) 孵育底液的配制(pH 9.2)

2% β-甘油磷酸钠	10ml
2% 巴比妥钠	10ml
2% 氯化钙	20ml
2% 硫酸镁	1ml
蒸馏水	5ml

2) 碱性磷酸酶钙钴法染色

碱性磷酸酶活性是成骨细胞分化成熟的重要标志之一，可采用细胞化学染色或定量测定。

(1) 细胞爬片固定：4℃甲醛-钙液固定 2h。

(2) PBS 缓冲液洗涤 2 次，每次 5min。

(3) 37℃孵育于底液，1.5h。

(4) 蒸馏水室温冲洗 1~2min。

(5) 2%硝酸钴内浸泡 2min。

(6) 蒸馏水室温冲洗 1min。

(7) 1%硫化铵洗 1min。

(8) 显微镜下观察实验结果。

3) Von Kossa 染色

Von Kossa 染色是广为应用的一种确定细胞外基质矿化的方法，只有成骨细胞在体外培养时能形成矿化的细胞外基质，一般培养至 6~8 周时即可出现。矿化区经 Von Kossa 染色呈阳性反应。

(1) PBS 缓冲液洗涤细胞爬片 3 次，每次 2min。

(2) 室温下中性福尔马林液固定 5min。

(3) 室温下蒸馏水洗涤 2 次。

(4) 5%硝酸银浸泡 2h。

(5) 紫外光照射 1h。

(6) 室温下蒸馏水冲洗 2 次。

(7) 5%硫代硫酸钠中和残留的硝酸银。

(8) 显微镜下观察实验结果。

4) I 型胶原测定

成熟的成骨细胞能合成 I 型胶原，它是成骨细胞的标志物之一。免疫组织化学染色 I 型胶原阳性反应主要出现在骨细胞核周围，也可用放射免疫法进行定量检测。

(1) 细胞爬片和冰冻切片用 PBS 洗涤 2 次，每次 3min。

(2) 4%多聚甲醛室温固定 30min。

(3) PBS 室温洗涤 2 次，每次 3min。

(4) 用含 0.1% Triton X-100 的 0.3% H_2O_2-甲醇溶液室温封闭 30min。

(5) 蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5min。

(6) 10%山羊血清工作液封闭，室温孵育 1h。

(7) 用浓度为 0.4%的胃蛋白酶浸泡 1h。

(8) 分别加入一抗为 I 型胶原单克隆抗体工作液 50μl，置于湿盒中 4℃过夜。同时设立阴性对照，即用 PBS 代替一抗进行免疫组化染色。

(9) PBS 洗涤 1 次，每次 3min。

(10) 滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液，37℃孵育 15min。

(11) PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

(12) DAB 试剂盒显色 10min。

(13) 蒸馏水冲洗后，复染。

(14) 二甲苯透明后中性树胶封片。

(15) 显微镜下观察实验结果。

4.2.3.1.4 结果

1) 形态学变化

在培养的第 7 天，可观察到少许 MSC 细胞逐渐由梭形变为多角形，随着时间的延长，多角形的细胞增多并聚集成团。培养 21 天后，可观察到较大的细胞结节(图 4.10)。

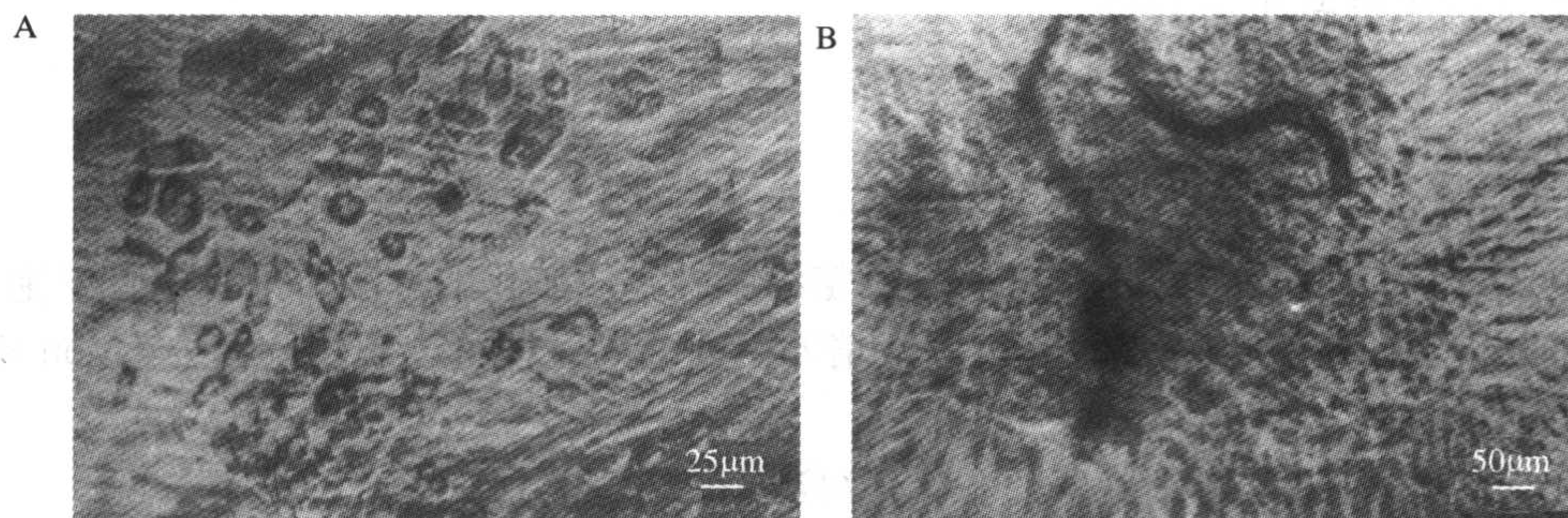


图 4.10 光镜下动态观察骨诱导过程中细胞形态的变化

A. 诱导 7 天后观察有少数的多角形细胞；B. 诱导 21 天后观察多角细胞增多并聚集成团的现象

2) 碱性磷酸酶染色

用钙-钴法检测 MSC 向骨细胞分化过程中碱性磷酸酶的表达情况，在诱导培养的第 7 天，可观察到碱性磷酸酶呈弱阳性反应，阳性细胞呈褐色至黑色。诱导 14 天后碱性磷

酸酶呈强阳性反应。

3) Von Kossa 检测沉积

在骨诱导培养的第 21 天，用 Von Kossa 方法可检测到钙沉积的情况。镜下观察到 Von Kossa 强阳性为较大的黑色结节，成骨细胞因包埋在钙化基质中而见不到清晰的细胞轮廓。

4) 免疫组化检测 I 型胶原表达情况

骨诱导培养 21 天，免疫组化 SP 法可检测到 I 型胶原表达，在结节周围呈黄褐色。

4.2.3.1.5 注意事项

MSC 的分化能力会随扩增代数的增高而降低，因而应尽量使用代数较早的细胞。

4.2.3.2 MSC 向软骨细胞的诱导分化

1) 材料与试剂

高糖 DMEM、FBS、6.25μg/ml 胰岛素、6.25μg/ml 转铁蛋白、1.25μg/ml 牛血清白蛋白、1mmol/L 丙酮酸钠、5.35μg/ml 亚油酸、50μg/ml 维生素 C、10^{-7}mol/L 地塞米松、10ng/ml TGF-β、爱茜蓝(alcian blue)、II 型胶原单克隆抗体。

2) 诱导步骤

(1) 取扩增 MSC 以 1.5×10^{8} 个/L 的细胞密度接种于预先放置有消毒处理好的盖玻片的 6 孔板内。

(2) 细胞贴壁后更换培养液。特定的无血清软骨培养液的组成成分为：高糖 DMEM，胰岛素(6.25μg/ml)，转铁蛋白(6.25μg/ml)，牛血清白蛋白(1.25μg/ml)，丙酮酸钠(1mmol/L)，亚油酸(5.35μg/ml)，维生素 C(50μg/ml)，地塞米松(10^{-7}mol/L)。

(3) 转移 1ml 细胞悬液于 15ml 塑料锥形离心管内，500r/min 低速离心 15min，使细胞形成微团。

(4) 加入 10ng/ml TGF-β，置于 37℃、5% CO_2 的孵箱内培养。

(5) 每 2~3 天用上述培养基加新鲜的 TGF-β 换液。

3) 软骨细胞的鉴定

(1)爱茜蓝染色：

a. 聚集诱导软骨培养 18、21 天的细胞团经冰冻切片机切成厚度为 5μm 的切片。

b. 甲醇 4℃固定 10min。

c. 室温下切片用去离子水洗 3 次，每次 2min。

d. 浸于 10%爱茜蓝中室温过夜。

e. PBS 缓冲液洗 3 次后镜下观察细胞形态。

(2) II 型胶原测定：一抗为 II 型胶原单克隆抗体。检测步骤与骨细胞的鉴别中 I 型胶原的测定相同。

4) 结果检测

在细胞聚集培养 24h 后，加入地塞米松及 TGF-β的细胞团与管壁分离，并可在试管中持续生长长达 30 天。培养第 18 天，切片经爱茜蓝染色可观察到蓝染的软骨细胞(图 4.11A)，II 型胶原弱阳性分布于软骨细胞切片的周边。培养第 21 天，II 型胶原呈强阳性(图 4.11B)。

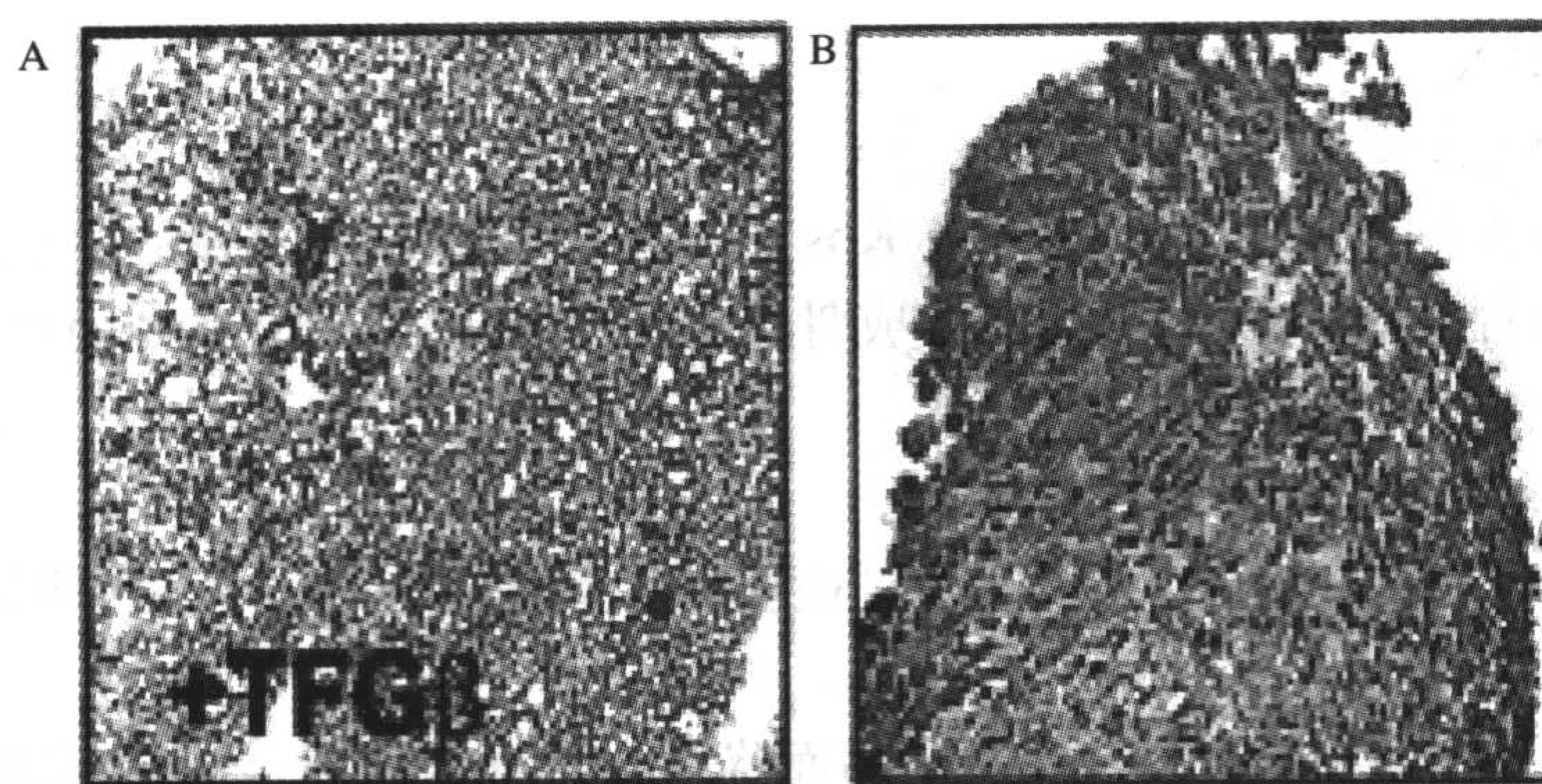


图 4.11　爱茜蓝染色显示软骨细胞分泌的黏多糖(A)(蓝色为阳性)和免疫组化法显示 II 型胶原阳性(B)(另见书末彩图)

4.2.3.3　MSC 向脂肪细胞的诱导分化

MSC 在 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤、地塞米松、胰岛素和消炎痛等诱导下可向脂肪组织分化。分化的细胞可表达过氧化物酶体增殖激活的受体-2(PPAR-2)、脂蛋白脂酶和脂肪酶结合蛋白 aP2，且在细胞内出现富集的脂质小泡。在该培养条件下，约 95%的细胞向此系分化，细胞内的脂质小泡持续增加直至充满细胞。

1) 材料与试剂

高糖 DMEM、FBS、地塞米松 1μmol/L、胰岛素 10mg/L、0.5mmol/L 1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤、100μmol/L 吲哚美辛、2%油红 O(称取 2g 油红干粉溶于 100ml 的 70%乙醇中，研磨，过滤，室温保存)。

2) 诱导步骤

(1) 取体外扩增培养的 MSC，置于孔板或培养皿中。

(2) 当细胞贴壁生长达到 80%融合时，加入脂肪诱导试剂：含地塞米松 1μmol/L 、胰岛素 10mg/L，0.5mmol/L 1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤，100μmol/L 吲哚美辛，置于 37℃、5% CO_2 的孵箱内培养。

(3) 对照组加常规培养液(DMEM+10% FBS)。

(4) 每 3~4 天换液一次。

3) 油红 O 染色

(1) 取诱导培养组和未诱导培养组的细胞，甲醇固定 2min。

(2) 70%乙醇漂洗。

(3) 加入 2%油红 O 染料染色，室温 5min。

(4) 弃去染液，70%乙醇漂洗后，用水冲洗。

(5) 苏木精复染 1min。

(6) 镜下观察脂肪细胞形态及染色情况。

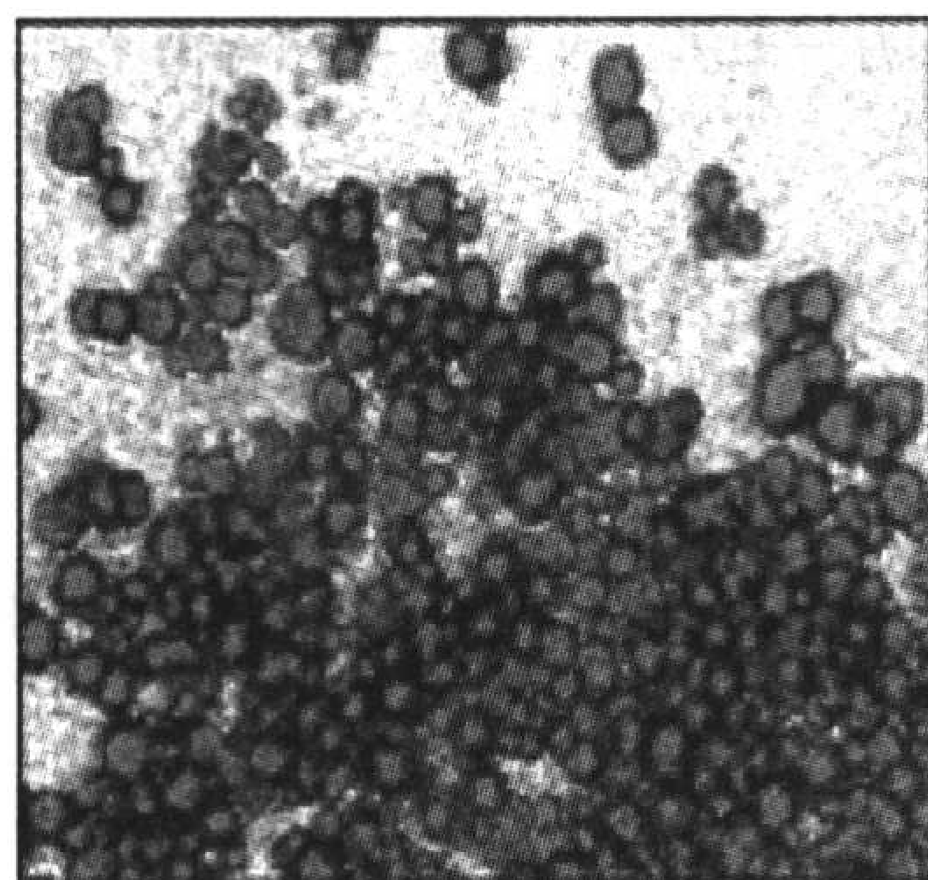


图 4.12　油红 O 染色显示脂肪细胞(20×)(另见书末彩图)

4) 结果

MSC 原代培养成脂诱导 7 天后，细胞胞质内开始出现细小脂滴；诱导 14 天后细胞胞质内形成高折光性的脂滴，脂肪细胞主要集中在克隆中心，提高放大倍数可清晰地观察到胞质内的脂滴；而且随着培养时间的延长，诱导培养 21 天，脂肪滴逐渐增大可充满整个细胞，当加入油红 O 染液显示胞核呈蓝色，脂滴呈橙红色(图 4.12)。脂肪细胞平均占(88±4.6)%。对于对照组进行光镜下观察和油红 O 染色均未见脂滴。

4.2.3.4 MSC 向心肌细胞的诱导分化

5-氮胞苷(5-azacytidine，5-aza)可在体外诱导 MSC 分化为心肌样细胞。研究表明，5-aza 是一种去甲基化药物，它可以与控制向心肌分化的特异启动子基因上的阻遏蛋白结合，使其去甲基化，发生构型改变，从而启动干细胞向心肌的分化。

4.2.3.4.1 材料与试剂

5-aza、羊抗肌钙蛋白 I (troponin I，TnI)多克隆抗体、小鼠抗人结蛋白(desmin)单克隆抗体、小鼠抗人 GATA4 抗体、羊抗连接蛋白 connexin43 抗体、兔抗山羊 IgG-FITC 和抗小鼠 IgG-TRITC。

4.2.3.4.2 诱导步骤

(1) 取分离培养后 3 代人 MSC 细胞，用 0.25%胰蛋白酶消化。

(2) 以 2×10^5 个/cm^2 的密度接种于 24 孔塑料培养板中。

(3) 在完全培养液中加入 3μmol/L、5μmol/L、10μmol/L 5-aza。

(4) 诱导分化 24h 后，吸弃培养液。

(5) PBS 清洗 2 次，继续用不含诱导剂的完全培养液培养。

(6) 每 2~3 天换液 1 次。

(7) 光学显微镜动态观察诱导后不同时间的细胞形态变化。

4.2.3.4.3 心肌细胞的鉴定

1) 细胞免疫荧光检测

(1) 细胞爬片用 PBS 洗涤 2 次，每次 5min。

(2) 4%多聚甲醛室温固定 15min。

(3) PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

(4) 含 0.1% Triton 和 0.3% H_2O_2 的甲醇溶液封闭 10min，以消除内源性过氧化物酶。

(5) 蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5min。

(6) 山羊血清工作液室温孵育 15min。

(7) 去血清后分别加 cTnI(心肌特异性肌钙蛋白 I 特异性抗体)和单克隆抗体工作液 50μl，置于湿盒中 4℃过夜。

(8) PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

(9) 滴加荧光标记的二抗(兔抗山羊 IgG-FITC 和抗小鼠 IgG-TRITC)工作液，37℃孵育 30min。

(10) PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

(11) 直接在荧光显微镜下观察结果。

2) RT-PCR 检测分化细胞心肌特异因子β-MHC 的表达

分别提取 2、7、11 代未诱导的 hMSC(对照)和 10μmol/L 的 5-aza 诱导后 21 天的细胞总 RNA，逆转录后进行 PCR。β-MHC 基因全长 688bp，根据全长设计 PCR 引物：上游引物：5′-ATCAAGGAGCTCACCTACCAG-3′，下游引物：5′-TCGACAATGTGTCCGAGGTC-3′。同时用 GAPDH 作参照。

4.2.3.4.4 结果

1) 形态学变化

经 5μmol/L、10μmol/L 的 5-aza 进行化学诱导后细胞形态变长，体积增大，诱导后 14 天时 20%的 5μmol/L 浓度组细胞及 30%的 10μmol/L 浓度组细胞出现细胞融合形成多核肌管样结构；诱导后 21 天时细胞出现分叉，呈树枝样(图 4.13)。3μmol/L 浓度组 hMSC 在诱导后细胞形态略长，未出现肌管结构。3 组中 3μmol/L 浓度组 hMSC 细胞增殖最强，10μmol/L 浓度组细胞发生细胞空泡样变性的比例较大，而且细胞增殖能力下降。

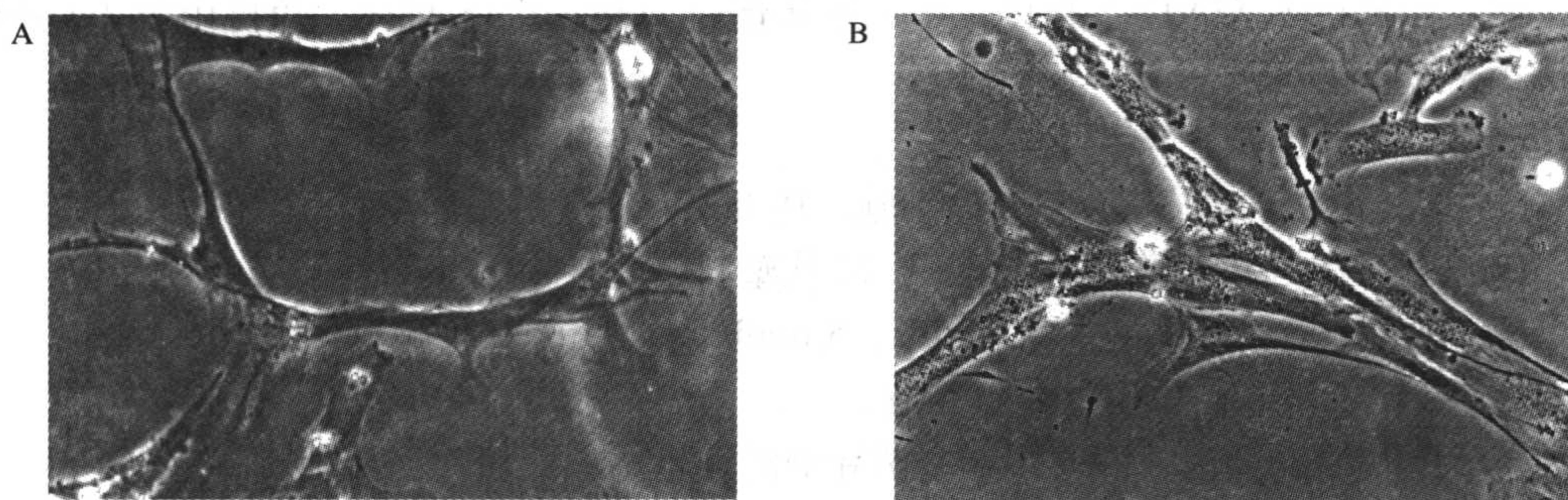


图 4.13 10μmol/L 的 5-aza 诱导后 14 天 hMSC 形态(A)(相差×200)和 10μmol/L 的 5-aza 诱导后 21 天 hMSC 形态(B)(相差×200)

2) 细胞免疫荧光染色结果

细胞核经 DAPI 衬染后在紫外光激发下呈蓝色荧光。对照组未经诱导的 MSC 胞质内不表达单克隆抗体和 cTnI，细胞不着色；而诱导后 21 天，5、10μmol/L 浓度组 hMSC 可见单克隆抗体表达阳性(红色荧光)，cTnI 表达阳性(绿色荧光)，心肌早期转录因子 GATA4 染色阳性(红色荧光)、连接蛋白 connexin43 的表达阳性(绿色荧光)(图 4.14)。后 3 种蛋白质的阳性染色提示 hMSC 经过诱导后可以向心肌细胞分化，并具有心肌细胞特有的结构蛋白。

分别随机选取 5 个高倍视野，进行细胞计数，10μmol/L 组的 cTnI 阳性染色细胞数目(65.3±4.7)%高于 5μmol/L 诱导组(48.2±5.4)%($P<0.05$)；3μmol/L 组 MSC cTnI 等特异性蛋白阳性染色细胞低于 5%，阴性对照组各种抗体染色均为阴性。

3) RT-PCR 结果

hMSC 经 5-aza 诱导后 21 天所分化的心肌样细胞经 RT-PCR 显示，诱导后细胞在 mRNA 水平表达心肌细胞特异肌凝蛋白重链β-MHC，而未经诱导的 MSC 无β-MHC 的表达。

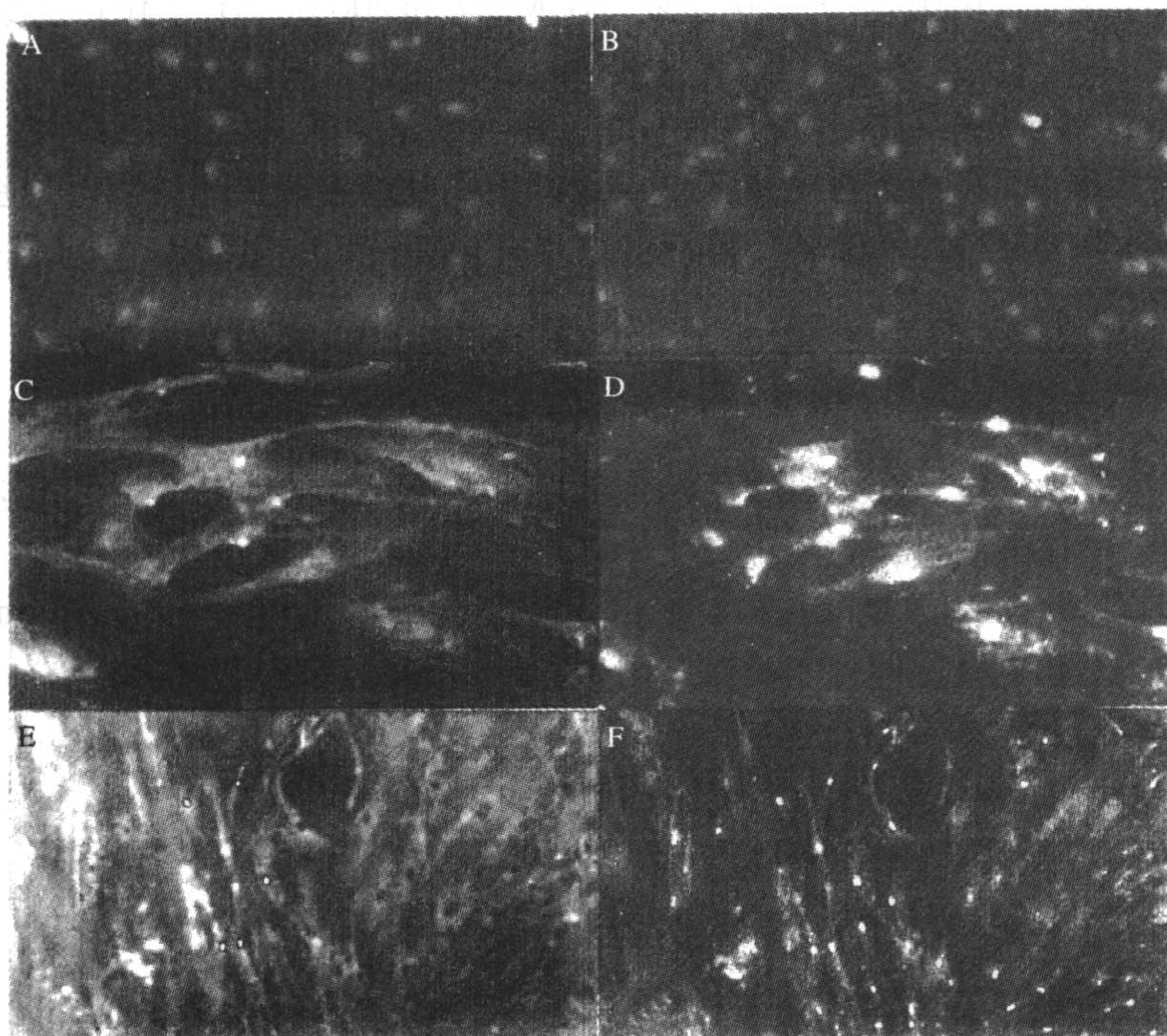


图 4.14　hMSC 经四层双重荧光素-免疫荧光检测心肌特异性蛋白

A. 对照组 desmin 及 cTnI 荧光双标染色阴性(200×)；B. 对照组 GATA4 及 connexin43 荧光双标染色阴性(200×)；C.10μmol/L 5-aza 诱导后 desmin 染色阳性(200×)；D. 10μmol/L 5-aza 诱导后 cTnI 染色阳性(200×)；E. 10μmol/L 5-aza 诱导后 GATA4 染色阳性(200×)；F. 10μmol/L 5-aza 诱导后 connexin43 染色阳性(200×)(另见书末彩图)

4.2.3.4.5　注意事项

(1) 经 5-aza 诱导后 MSC 可以出现肌系细胞的蛋白质表达及心肌特异性基因β-MHC mRNA 表达，表明 MSC 具有向肌系细胞分化的能力。由于诱导后的细胞在形态及功能上与成熟的心肌还存在一定差异(如未能观察到诱导细胞的自发搏动)，故称为“心肌样细胞”。

(2) 5-aza 诱导 MSC 分化为心肌细胞的效率较低，因此如何提高诱导效率及明确其分化机制等难题亟待解决。

4.2.3.5　MSC 向神经细胞的诱导分化

4.2.3.5.1　材料与试剂

3μmol/L β-巯基乙醇、2%二甲基亚砜(DMSO)、200μmol/L 丁化羟基苯甲醚(BHA)、鼠抗人的神经丝蛋白(NF)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)单克隆抗体和甲苯胺蓝。

4.2.3.5.2　操作步骤

(1) 取体外扩增的 MSC，以 8.0×10^3 个/cm^2 的细胞密度接种于 6 孔板中，培养条件为 DMEM+10% FBS。

(2) 当细胞达到 60%~70%融合时，用 3μmol/L β-巯基乙醇预诱导 24h，培养条件为 DMEM+20% FBS。

(3) PBS洗涤后，再用2%的二甲基亚砜(DMSO)和200μmol/L丁化羟基苯甲醚(BHA)进行正式诱导。

(4) 每隔30min观察一次，直至细胞形态无明显变化。

(5) 同时采取另一种诱导方法进行诱导，即用同样的方法预诱导后再分别用含1、3、5、7、10μmol/L BME的DMEM培养液代替含2% DMSO和200μmol/L BHA的DMEM培养液诱导MSC。

4.2.3.5.3 神经细胞的鉴定

1) *免疫组织化学染色*

分别取诱导2h、4h、6h、12h后的细胞爬片，参照Histostain™-SP(链霉卵白素-过氧化物酶)试剂盒操作方法进行免疫组织化学染色。一抗为鼠抗人的神经丝蛋白(NF)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)单克隆抗体，二抗为羊抗鼠IgG。阴性对照用0.01mol/L的PBS代替NSE和NF单克隆抗体，实验对照用未诱导的MSC细胞爬片直接进行NF和NSE免疫组织化学染色。

另取诱导后4h、6h、8h的细胞爬片，用甲苯胺蓝染色，观察尼氏体。染色步骤如下：

(1) 细胞爬片用PBS洗涤3次，每次5min。

(2) 10%中性福尔马林固定30min，PBS洗涤30min。

(3) 0.5%的甲苯胺蓝染色3min。

(4) 去离子水洗。

(5) 95%乙醇分色，显微镜下控制分色时间至细胞结构清晰为止。

(6) 100%乙醇脱水2次，每次2min。

(7) 二甲苯透明10min。

(8) 中性树胶封片。

(9) 显微镜下观察结果。

2) *MSC向神经细胞诱导后Nestin基因的检测*

提取诱导后细胞的总RNA，逆转录后进行PCR。*Nestin*基因全长495bp。根据全长设计PCR引物：上游：5′-AGAGGGGAATTCCTGGAG-3′；下游：5′-CTGAGGACCA-GGACTCTCTCT-3′。同时用GAPDH作参照。

4.2.3.5.4 结果判定

1) *MSC向神经细胞转化过程中的形态变化*

在预诱导后12h发现原来大而扁平的MSC胞体发生收缩，细胞边缘变的不规整，有许多细的指状突起，(图4.15)。预诱导结束时，一部分细胞胞体已变成近似圆形。正式诱导后的3h内细胞发生了明显的形态学变化，细胞胞体进一步收缩，形成圆形、不规整的锥形、三角形，有的细胞有多个突起，而且发出分支，终末端有类似神经元细胞的终结；有的突起逐渐伸长，形成圆锥状终末端，类似于Golgi I型神经元的长轴突(图4.15B~F)，5h后细胞形态基本不再发生明显变化，有80%以上的细胞呈现典型的神经元样表型。

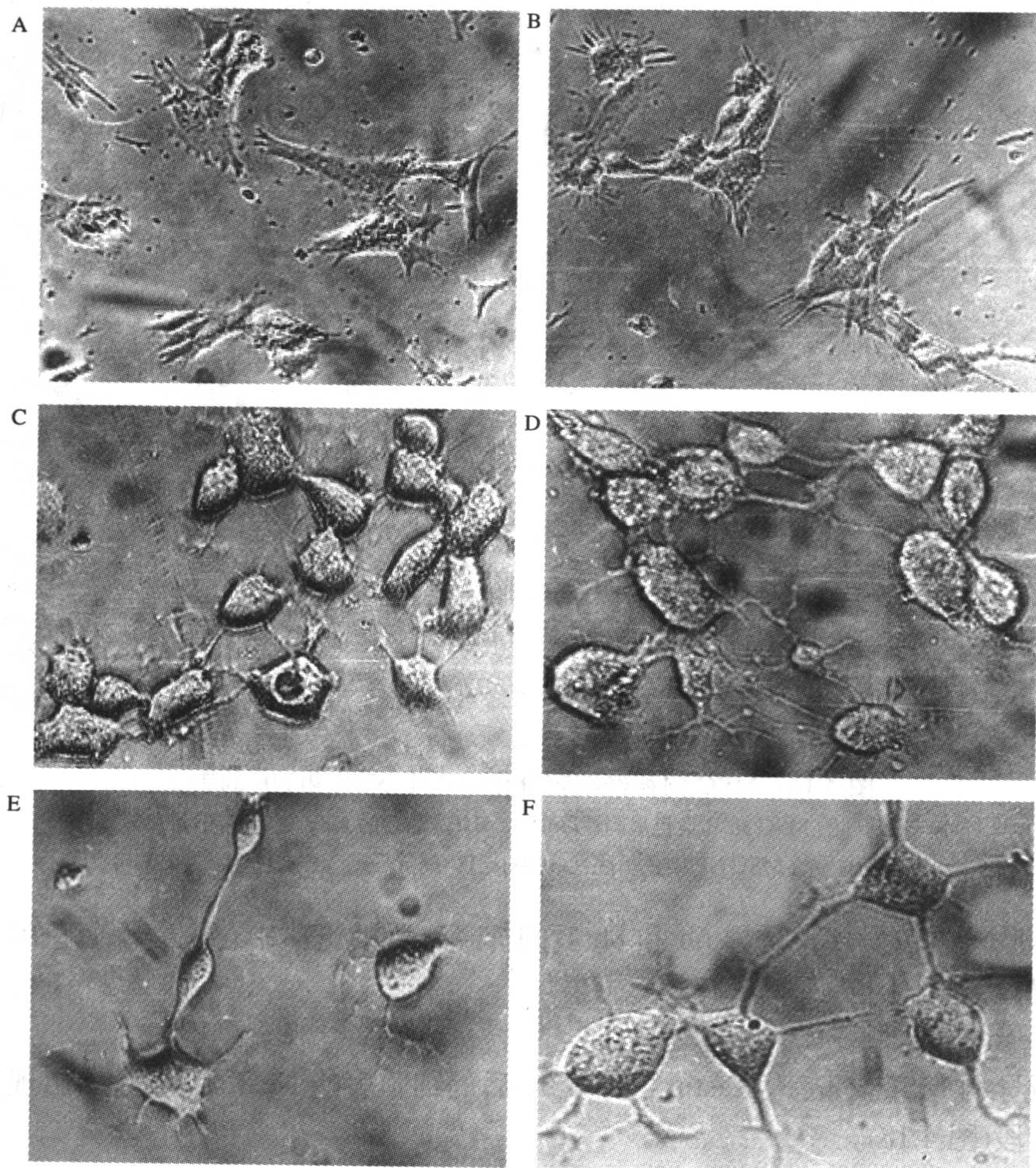


图 4.15　光镜下观察 MSC 被诱导而向神经细胞转化过程中形态的变化

A. 预诱导 12h 后的细胞；B~F. 诱导后 0.5h、1.5h、2.5h、3.5h 的细胞形态变化

(A~C、E 为 200×；D、F 为 400×)

分别用含 1、3、5、7、10μmol/L *β*-巯基乙醇的 DMEM 培养液诱导 MSC，均可观察到典型的神经细胞，只是转化率较用含 2% DMSO 和 200μmol/L BHA 的 DMEM 培养液诱导时低。

2) 免疫组织化学和组织化学染色结果

在诱导 MSC 向神经细胞分化过程中，取诱导 2h、4h、6h、12h 后的细胞爬片，检测 NSE 和 NF 的表达情况。观察发现，未诱导的 MSC 不表达 NSE 和 NF，细胞不着色(图 4.16A、C)。诱导后不同时间的细胞均有 NSE 和 NF 表达。阳性细胞呈棕褐色。NSE 阳性细胞表现为弥漫性胞质着色(图 4.16B)；NF 在核周和突起均有表达(图 4.16D)。

不同扩增代数的骨髓 MSC 向神经细胞分化后均表达 NSE 和 NF。不同代数的 MSC 分化过程中 NSE 和 NF 阳性率(显微镜下记数 100 个细胞中 NSE 和 NF 阳性的细胞数，分别随机记数 5 次)，经统计学分析无显著性差异($P>0.05$)。

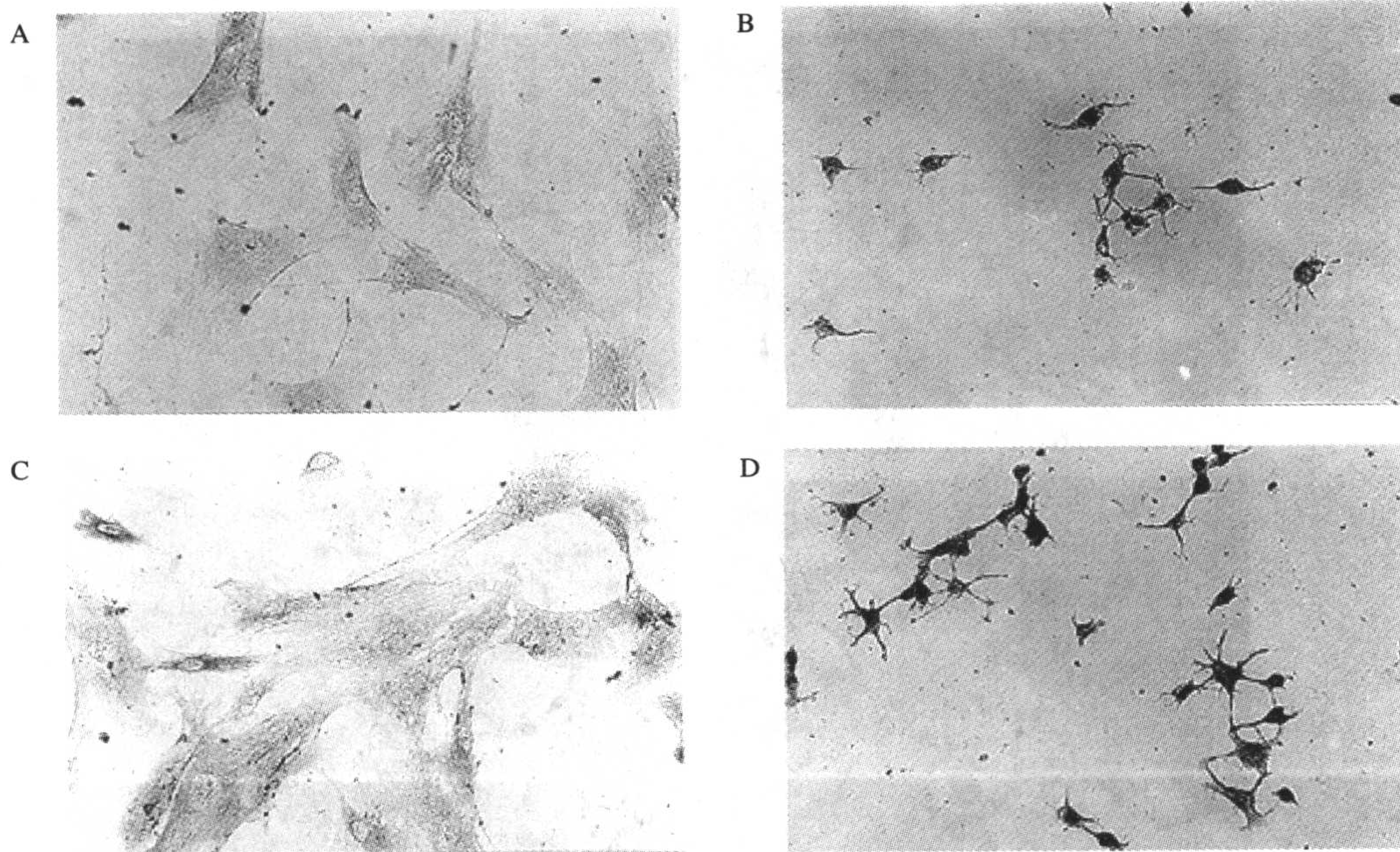


图 4.16　MSC 向神经细胞分化过程中 NSE 和 NF 的表达

A. 未诱导的 MSC NSE 染色呈阴性(330×)；B. 诱导后的 NSE 染色呈阳性(330×)；
C. 未诱导的 MSC NF 染色呈阴性(330×)；D. 诱导后的 NF 染色呈阳性(330×)

甲苯胺蓝染色发现，诱导 6h 和 8h 后的神经细胞的胞质中存在着深蓝色的块状或颗粒状的尼氏体(图 4.17)。

3) Nestin 的检测

未诱导的 MSC 不表达 Nestin，诱导 5h 后的细胞表达 Nestin，电泳后出现 495bp 的特异性片段(图 4.18)。

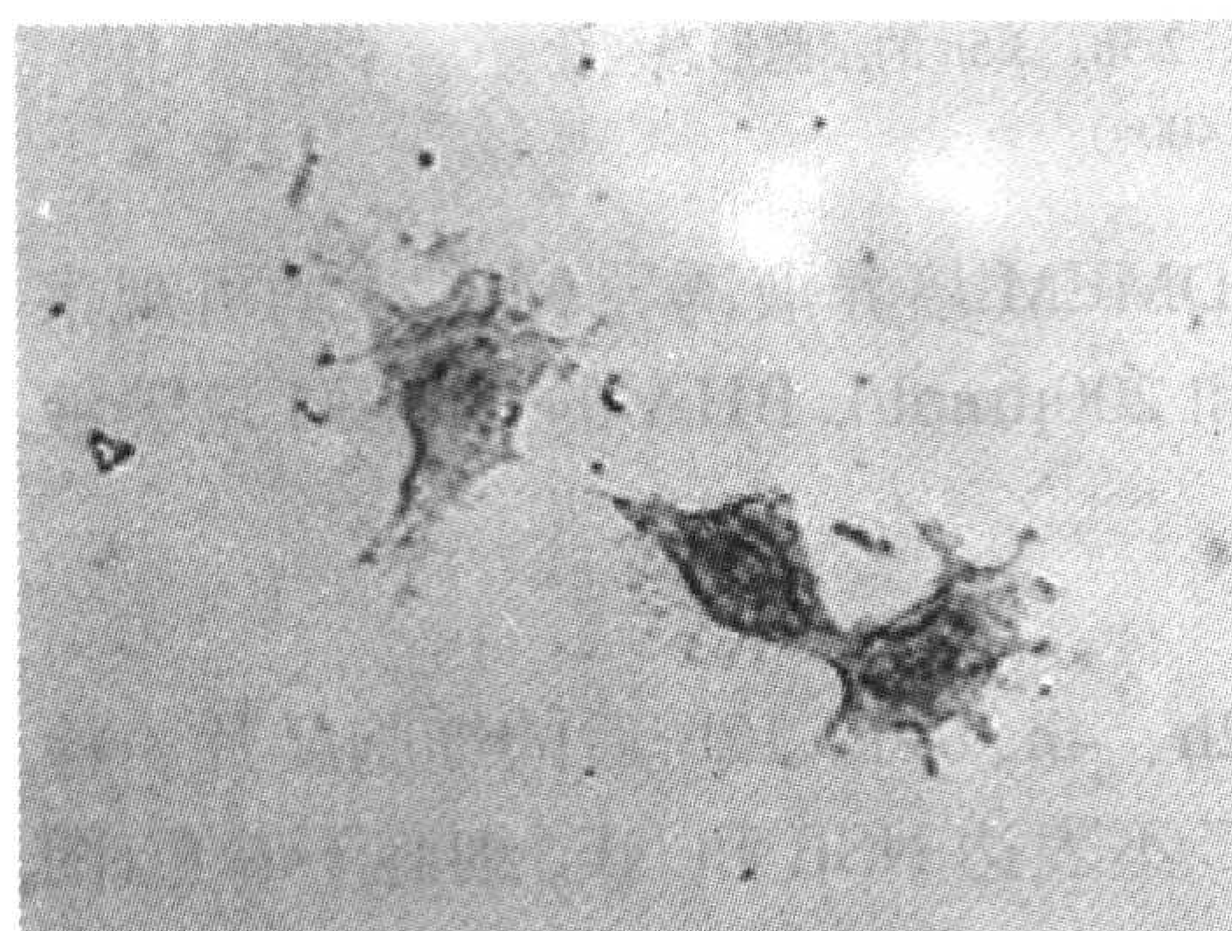


图 4.17　诱导 8h 的神经细胞尼氏体染色(660×)

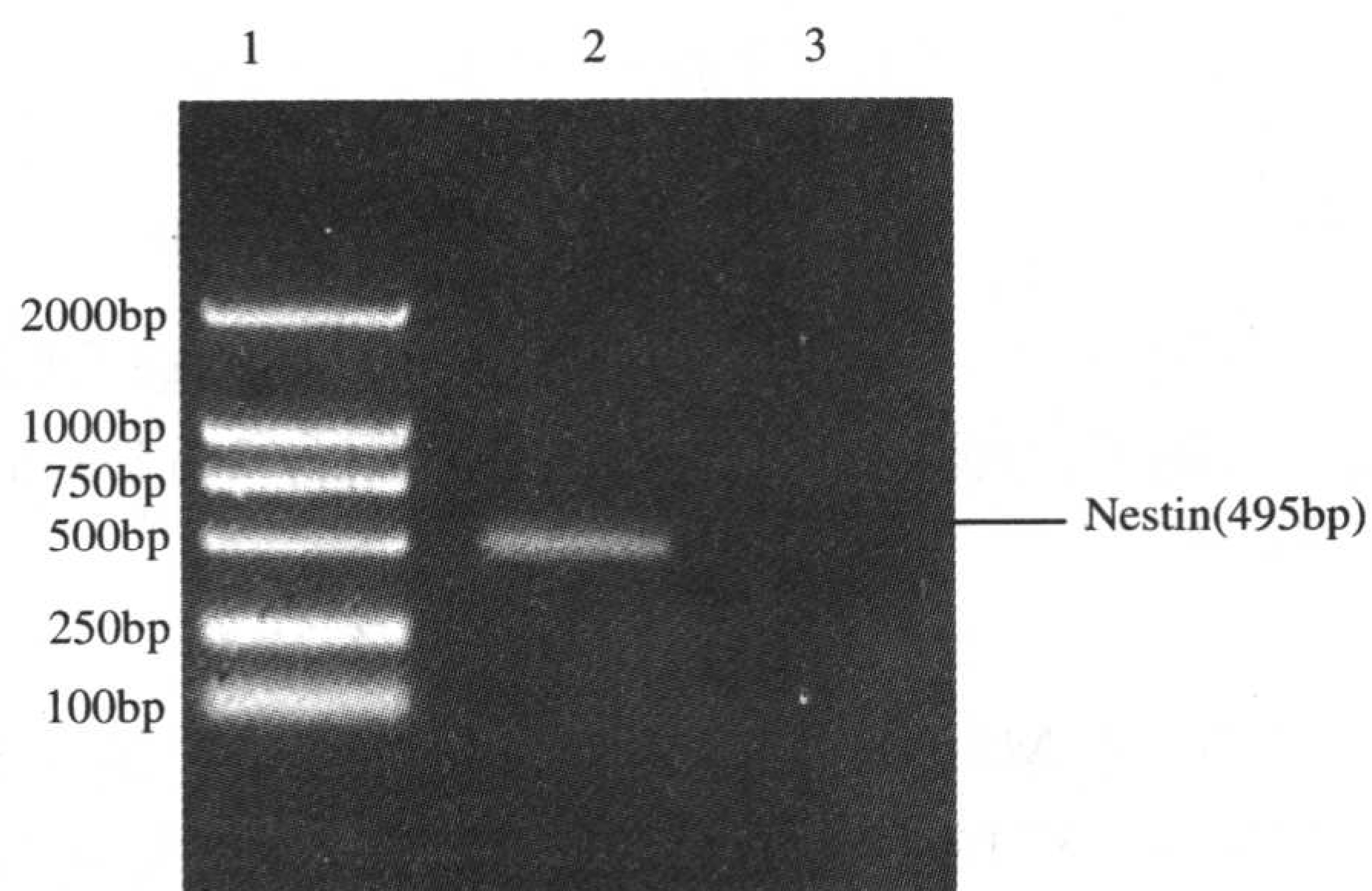


图 4.18　MSC 诱导前后 Nestin 的表达

诱导前的 MSC 不表达，诱导 5h 后表达。1. 分子量标准物；2. 诱导后 MSC；3. MSC

(高艳红　裴雪涛)

4.3 神经干细胞

大量研究表明发育和成熟的神经系统内均存在着神经干细胞(neural stem cell, NSC)。发育过程中的胎脑的纹状体、海马、皮层脑室区等多个部分都含有大量的神经干细胞；而在成年哺乳动物体内的多个区域也同样可以分离出神经干细胞，如海马齿状回的颗粒下层、侧脑室的室管膜下区、大脑皮层、小脑和脊髓等。不同来源的神经干细胞的培养扩增的方法大致相同，故我们以胚胎大鼠神经干细胞的分离培养扩增方法为例。但值得注意的是，不同来源的神经干细胞对生长因子的反应性存在差异，所以可以对无血清限定培养液中的细胞因子种类和浓度进行调整。

4.3.1 大鼠胎脑和胚胎脊髓神经干细胞的分离培养扩增

4.3.1.1 大鼠胎脑和胚胎脊髓 NSC 的分离、培养

(1) 仪器、材料和试剂：

洁净工作台；二氧化碳培养箱；电子分析天平；电热保温干燥箱；倒置显微镜；荧光显微镜；Milli-Q 超纯水制备系统；调温低速离心机；孕鼠；手术器械；75%乙醇；bFGF；EGF；DMEM/F12(1∶1)培养基；胎牛血清；DNase I；多聚赖氨酸；胰蛋白酶；神经细胞培养添加剂 B27；D-Hank 缓冲液；PBS 缓冲液。

(2) 将怀孕 13 天的 S-D 鼠用颈椎脱臼法处死，于 75%乙醇中浸泡消毒 10min。

(3) 无菌条件下剪开孕鼠腹部，取出胎鼠，放入预冷的 D-Hank 缓冲液中浸洗 2 次。

D-Hank：氯化钾 0.4g/L、磷酸二氢钾 0.06g/L、氯化钠 8.0g/L、碳酸氢钠 0.35g/L、磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) 0.09g/L、酚红 0.02g/L。

(4) 解剖显微镜下仔细分离胎脑及胚胎脊髓，分离的组织用 D-Hank 缓冲液冲洗后，小心去除表面的脑膜组织。

(5) 将分离的胎脑和胚胎脊髓组织剪成约 $1mm^3$ 的碎块。

(6) 各加 1ml PBS 和 1ml 0.25%的胰蛋白酶，在 5% CO_2 培养箱中 37℃消化 20min。

(7) 加含血清的培养基以终止消化。

(8) 加 5μl DNase I (15U/μl)在 5% CO_2 培养箱中 37℃消化 10min。

(9) 用吸管吹打成单细胞悬液，细胞计数，1200r/min 离心 5min，弃上清。

(10) 把细胞按 1×10^6 个/ml 的密度接种入 NSC 培养液中，每日在显微镜下观察细胞的生长情况，注意培养基有无混浊和异物。隔日半量换液，7~10 天传代一次。

NSC 培养液：DMEM/F12、bFGF 20ng/ml、EGF 20ng/ml、2% B27。

4.3.1.2 悬浮培养的 NSC 的传代

(1) 收集培养的神经球，离心(1200r/min，5min)。

(2) 弃上清，1ml 的 1×PBS 重悬细胞，加 1ml 0.25%胰蛋白酶。

(3) 37℃孵育 10min，将神经球消化成单细胞悬液，加含血清的培养基以终止消化。

(4) 视 NSC 的量加入适量的 DNase I 消化细胞碎片，37℃孵育 5min。

(5) 离心，弃上清，重悬细胞并计数，按 5×10^5~1×10^6 个/ml 的比例加入 NSC 培养基。

4.3.1.3 细胞单克隆实验

(1) 从原代培养形成的细胞克隆中选取单个细胞克隆，0.25% 胰酶消化后用巴氏吸管机械吹打使克隆分散成单个细胞。

(2) 台盼蓝染色计数后，将细胞稀释为 10^2 个/ml，取 10μl 加入到 96 孔板，并补入 NSC 培养液 200μl。

(3) 24h 后标记单细胞孔，继续培养。

(4) 每 3~4 天添加半量 NSC 培养液。

(5) 单细胞克隆长大后用胰酶消化机械分离成单细胞悬液，将一个克隆的所有细胞种入 T-25 cm^2 培养瓶中培养(培养基同前)，待次代克隆长成后连续传代。

4.3.1.4 结果分析

怀孕 13 天胎鼠脑组织和脊髓组织分离培养的原代细胞在无血清培养基中生长，少量细胞贴壁，培养 2 天后，有大量的细胞死亡，存活的细胞呈圆形，折光性强，部分细胞分裂形成包含有 2~4 个细胞的细胞团；第 3~5 天时，细胞团内细胞数目迅速增加，出现“神经球”样结构：细胞分裂(不完全排除细胞聚集)形成细胞团，呈悬浮状生长，细胞无明显的突起形成。至第 7~10 天可生长成为由数百个甚至上千个细胞形成的细胞团(图 4.19)。传代培养的 NSC 生长迅速，经 15 次传代培养后细胞数量平均增加 2.45×10^4 倍，细胞得到大量扩增。

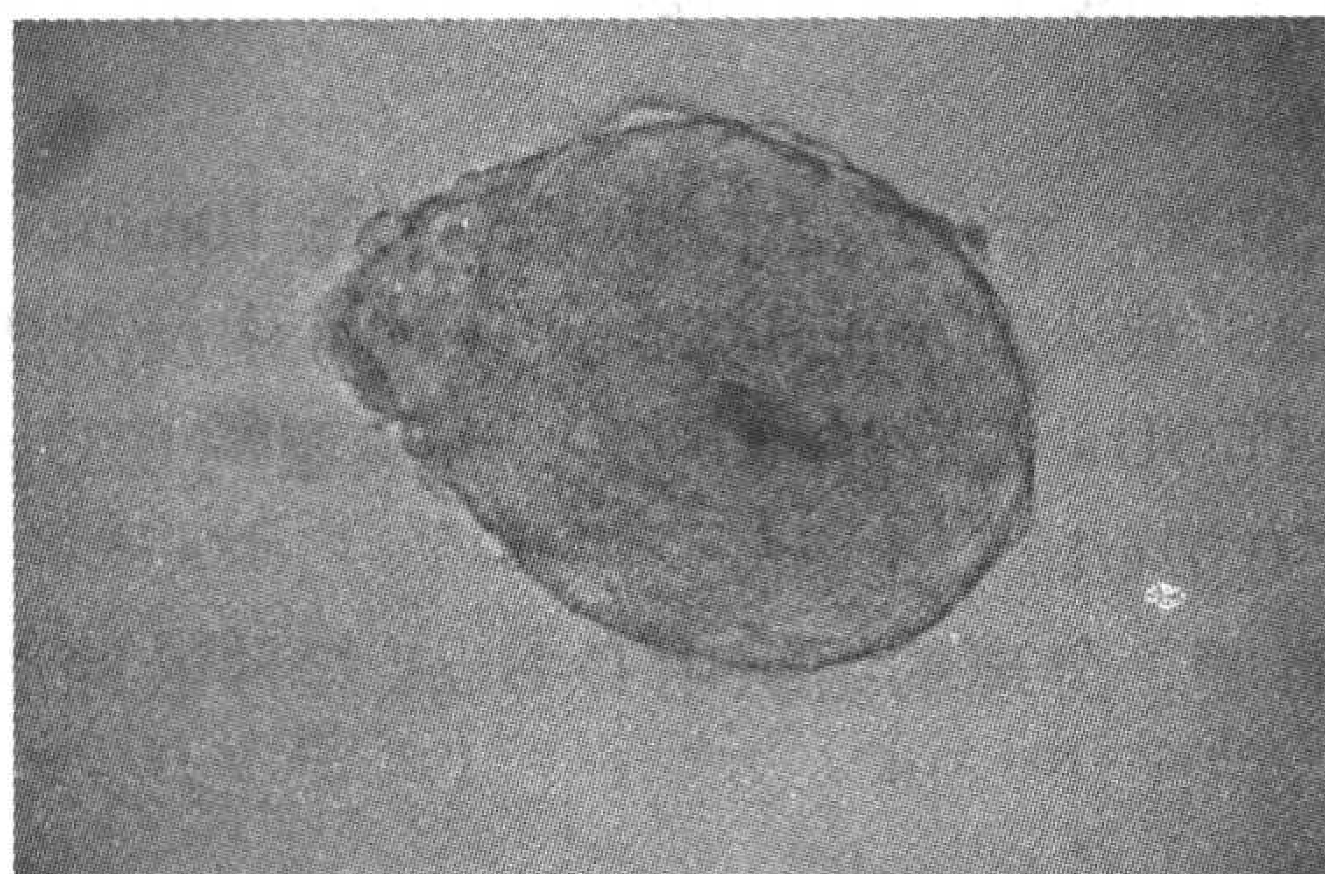


图 4.19 怀孕 13 天胚胎大鼠脑组织来源的神经球

4.3.2 神经干细胞的分化

4.3.2.1 神经干细胞的自然分化

(1) 材料和试剂：胎牛血清；DMEM/F12 培养液；4%多聚甲醛；小鼠抗-β-微管蛋白(tubulin)，抗-巢蛋白(nestin)，抗-半乳糖脑苷脂(galactocerebroside, Galc)单克隆抗体；兔抗-GFAP 单克隆抗体；各种荧光素标记二抗；免疫组化染色试剂盒；DAB 或 AEC 显色试剂盒。

(2) 取传至第 3 代、来源于同一个神经干细胞的亚细胞系克隆球，消化分离克隆制作单细胞悬液，按 1×10^6 个/ml 的比例种于预先放置多聚赖氨酸包被的盖玻片的 6 孔培养板中，并加入有血清培养基(10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液)，置 37℃、5% CO_2 培

养箱中培养 7~10 天。

(3) 观察细胞的自然分化状况、新形成的细胞形态，并用免疫细胞化学技术及细胞免疫荧光技术进行鉴定。原代和第 3 代 NSC 神经球或单个细胞进行巢蛋白(nestin，NSC 的特异标志蛋白)免疫细胞化学染色，第 3 代 NSC 在分化培养基中自然分化 7~10 天后对巢蛋白、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein，GFAP，星形胶质细胞的特异性标志蛋白)、β-微管蛋白(β-tubulin，神经元的特异性标志蛋白)和半乳糖脑苷脂(galactocerebroside，GalC，少突胶质细胞的特异性标志蛋白)进行染色，在随机选取的 10 个显微镜视野内对各种阳性细胞进行计数从而计算其比例，鉴定 NSC 的自然分化能力。具体步骤如下：

a. 标本用 4% 多聚甲醛固定 20min。

b. 4%多聚甲醛：40g 多聚甲醛溶解于 700ml PBS，加热到 60℃，不停搅拌，均匀溶解后再滴入 1mol/L NaOH 1~2 滴至完全澄清，冷却后补充 PBS 液至总量 1000ml。放 4℃冰箱备用。

c. 1×PBS 冲洗，5min×3 次。

d. 0.3%过氧化氢室温孵育 10min，以清除内源性过氧化物酶活性。

e. 蒸馏水冲洗，1×PBS 浸泡 5min。

f. 0.3% Triton X-100 于 37℃温育 20min，1×PBS 冲洗，5min×3 次。

g. 10%的正常山羊血清封闭非特异性抗原，室温下孵育 10min。

h. 倾去血清，勿洗，加一抗：抗-巢蛋白、抗-β-微管蛋白、抗-GFAP、抗-GalC。设立阴性对照：用不含一抗的抗体稀释液代替一抗工作液。4℃过夜或 37℃孵育 2h。

i. 1×PBS 清洗，5min×3 次。

j. 加链霉卵白素标记的二抗工作液 30~40μl(或荧光素标记二抗)，37℃孵育 30min。

k. 1×PBS 冲洗，5min×3 次。

l. 加辣根过氧化物酶标记的生物素 30~40μl(免疫荧光染色可直接进行荧光显微镜观察)，37℃孵育 30min。

m. 1×PBS 冲洗，5min×3 次。

n. DAB(或 AEC)显色液显色，室温下 5~10min，光镜下观察显色深浅适度后终止染色，自来水充分冲洗，脱水、透明及用中性树脂封片。

(4) 结果：本实验室的研究结果表明原代和第三代神经干细胞培养形成的“神经球”样结构和消化后的单个细胞呈巢蛋白染色阳性(图 4.20)。神经干细胞在用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 的分化培养基进行培养后，细胞在 24h 内即开始贴壁，48h 后细胞周围即可长出突起，3~5天后突起逐渐增长，部分突起可相互联系。这些新形成的神经细胞具有不同的形态，其中可见到胞体呈圆形或椭圆形、核大、具有 1 个或 2 个突起的神经元样细胞；也可见到有多个突起、胞核较小的星型胶质细胞。这些细胞包括分别呈 GFAP、β-微管蛋白和 GalC 染色阳性的细胞(图 4.21~图 4.23)，胚胎脊髓来源的 NSC 分化成的神经元、星型胶质细胞和少突胶质细胞的比例分别为(15.8±8.3)%、(72.5±5.0)%和(3.6±2.5)%，胎脑组织来源的 NSC 分化成这 3 种神经细胞的比例分别为(16.2±7.5)%、(74.9±7.0)%和(4.8±3.4)%。

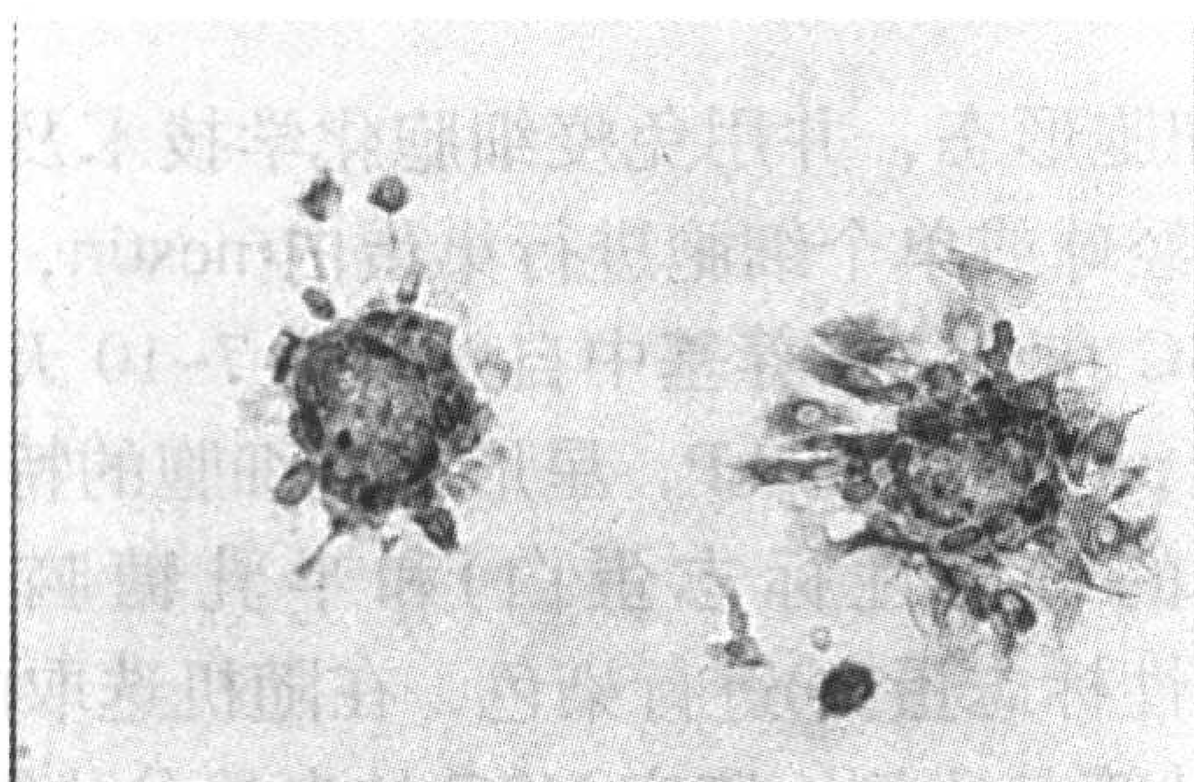


图 4.20　胚胎大鼠脑组织来源的神经球(巢蛋白染色)

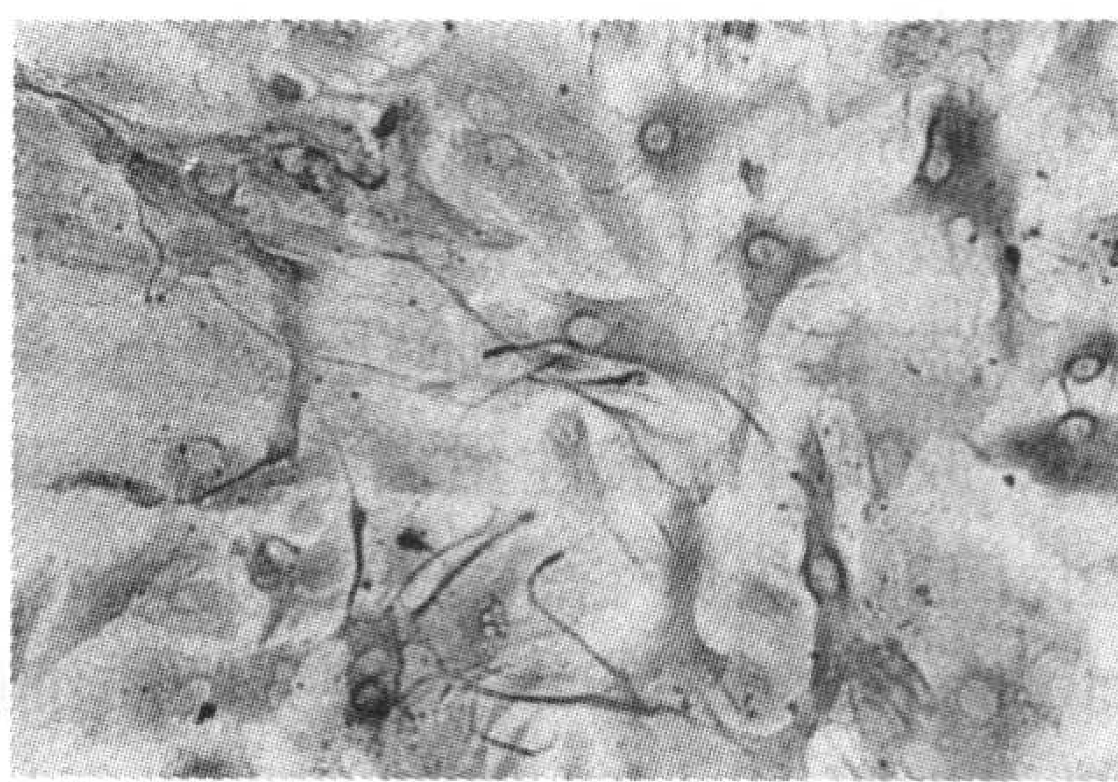


图 4.21　胚胎大鼠脊髓源性 NSC 分化形成的神经元(β-微管蛋白染色)

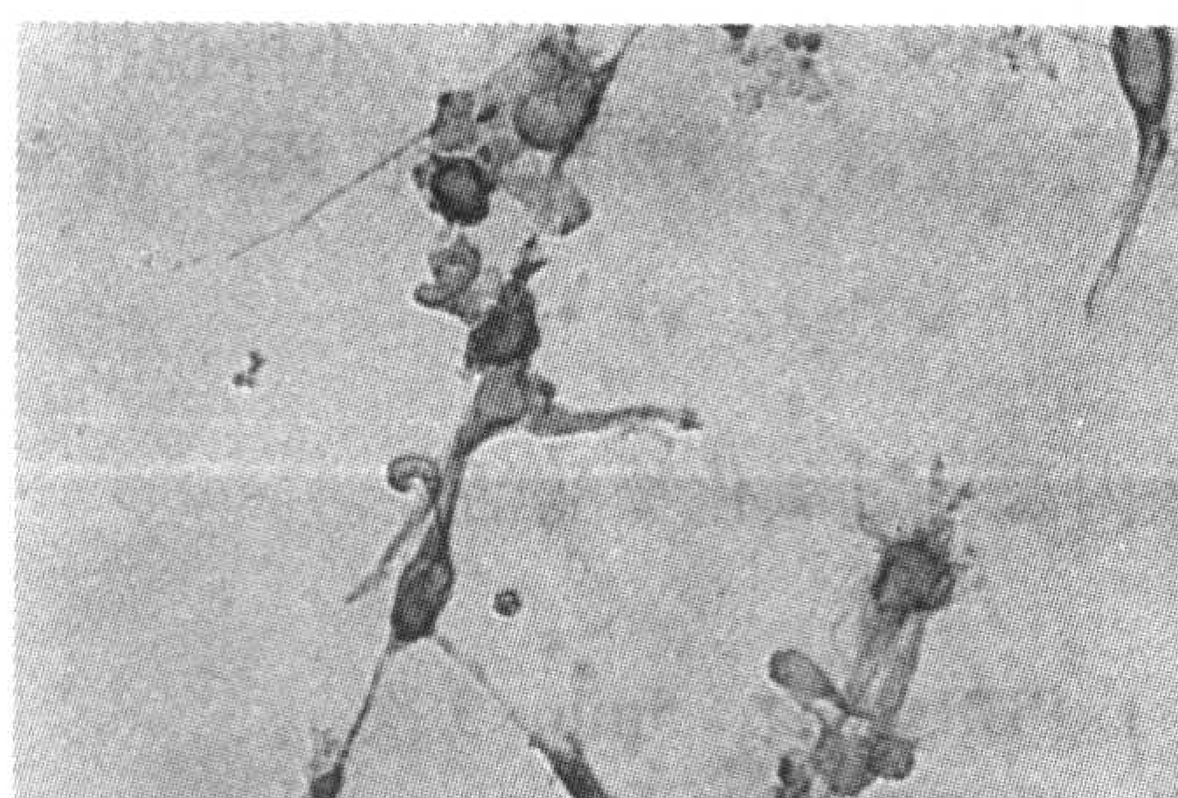


图 4.22　胚胎大鼠脊髓源性 NSC 分化形成的星形胶质细胞(GFAP 染色)

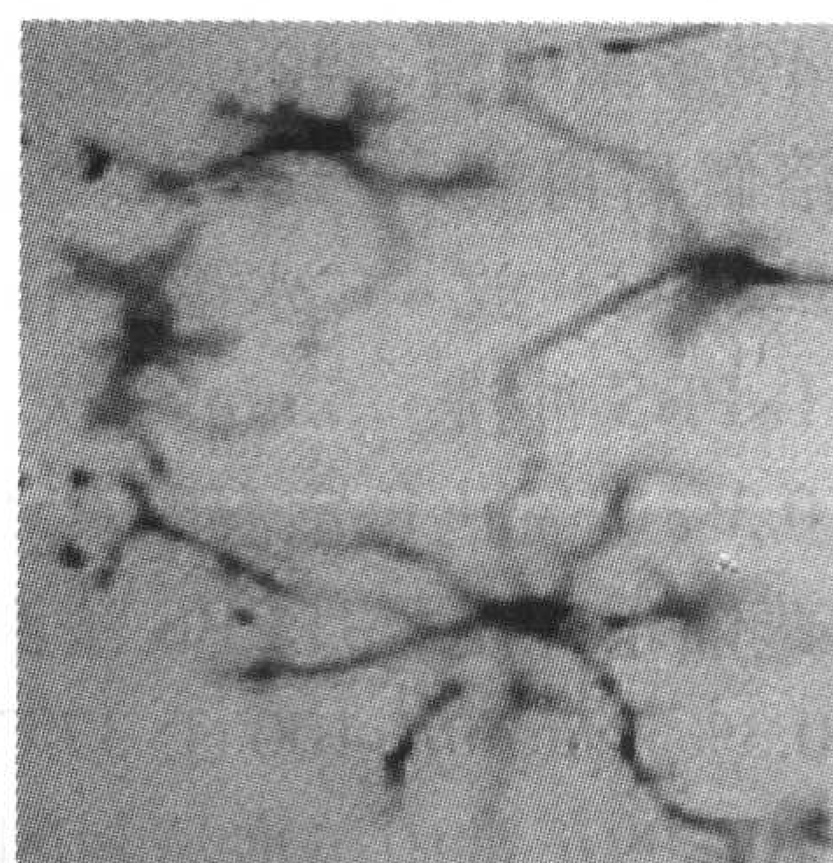


图 4.23　胚胎大鼠脊髓源性 NSC 分化形成的少突胶质细胞(GalC 染色)

4.3.2.2　神经干细胞向多巴胺能神经元分化

研究人员探索了多种诱导神经干细胞向多巴胺能神经元分化的方案，如使用血清、维甲酸(Yan et al. 2001)，或降低氧浓度(Studer et al. 2000)，或添加神经营养因子、造血生长因子(Carvey et al. 2001)、纹状体条件培养液等。各种条件诱导分化的多巴胺能神经元的比率、存活率、成熟度及分泌多巴胺的功能各有不同，因此很难评价哪种方案最优。故以我室研究的诱导方案为例，简述如下。

(1) 材料和试剂：

神经干细胞，DMEM/F12，B27，EGF，bFGF，抗大鼠多巴胺递质转运子(dopamine transportor，DAT)抗体，抗大鼠酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase，TH)抗体，抗坏血酸，IL-1，多聚赖氨酸。

(2) 将第三代的中脑 NSC 消化成单细胞悬液，以 5×10^4 个/ml 的密度接种于放置有多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔板内，1ml/孔，添加神经干细胞培养液贴壁培养 2~3 天。

(3) 2~3 天后，去除孔板内的旧培养液，添加诱导培养液：DMEM/F12，2% B27，抗坏血酸 100μmol、IL-1 100pg/ml。置 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 7 天。

抗坏血酸(ascorbic acid，100×)：AA 0.0176g 溶于 10 ml PBS 内，浓度为 0.01 mol/L。密闭分装，4℃保存。

(4) 每 3 天半量换液，第 7 天时终止诱导。

(5) 诱导分化效果检测：

a. 中脑 NSC 在传代过程中 DA 能神经细胞数量的变化：取原代细胞和传代培养的细胞，以 5×10^4 个/ml 接种于放置有多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔板内，1ml/孔，2~3 天贴壁后撤除生长刺激因子 EGF 和 bFGF，进行自发分化，7 天后通过免疫细胞化学染色检测酪氨酸羟化酶的表达情况。

b. 取定向诱导分化的细胞进行多巴胺能神经元特异性的功能酶-酪氨酸羟化酶和多巴胺递质转运子的免疫细胞化学检测，步骤同前。

c. 高效液相色谱-电化学检测多巴胺的分泌量，取材及操作方法可参考文献报道(Park et al. 2004，Serra et al. 2000)。

(6) 结果：免疫细胞化学检测发现只撤除生长因子而不加诱导剂的 NSC 很少分化为 TH 阳性细胞。抗坏血酸及 IL-1 均有诱导中脑神经干细胞向多巴胺能神经元分化的作用，诱导分化后的部分细胞表达 TH 及 DAT(图 4.24)。

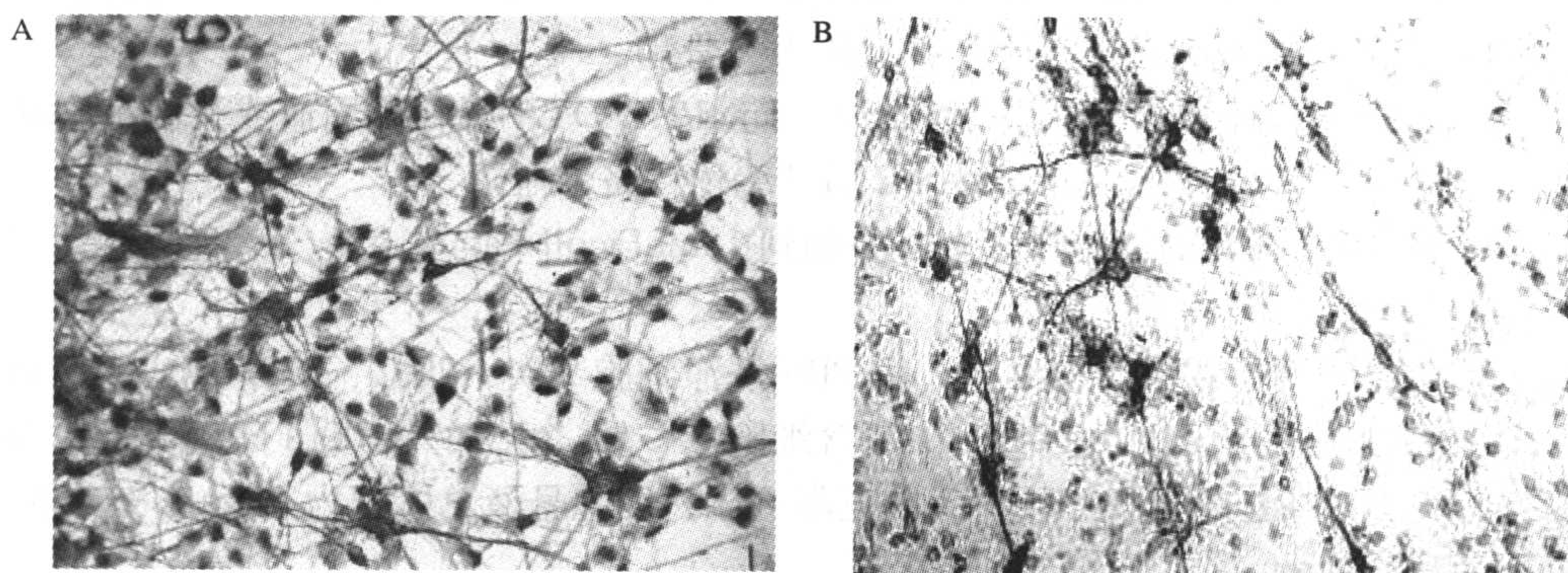


图 4.24 诱导分化后的细胞 TH(A)及 DAT(B)的表达情况

注意：①不同部位来源的 NSC 在分化方向上存在差异，中脑来源的神经干细胞更易于分化为多巴胺能神经元，非中脑来源的神经干细胞很难被诱导分化为多巴胺能神经元。②胎龄 11.5~12.5 天是中脑前体细胞分化为多巴胺能神经细胞的最佳时段。

4.4 血管内皮祖细胞

大量研究表明，胎肝、脐带血、骨髓和外周血中均含有血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cell，EPC)，这些内皮祖细胞主要表达 CD34、VEGFR-2、CD133 等表面标志，故利用这些标志可不同程度地富集 EPC。但由于血管内皮祖细胞与成熟的内皮细胞都具有一些相同的表面标志，包括 CD34、VEGFR-2、Tie-1、Tie-2 和 VE-钙黏着蛋白(vascular endothelial cadherin)等，所以通过上述标志筛选的细胞中可能混有成熟的内皮细胞。近年来报道 CD133 是一种 5 次跨膜的细胞表面分子，分子质量为 120kDa，它选择性地表达于骨髓和外周血造血干细胞及内皮祖细胞表面(Yin et al. 1997)。因此，采用 CD133 分选可排除血管壁脱落的成熟内皮细胞(Quirici et al. 2001)。

4.4.1 材料和试剂

①MACS 磁性分离仪、分离柱；②MACS 磁性细胞分离试剂盒($CD133^+$ 细胞、$UEA\text{-}1^+$ 细胞)；③脐带血、外周血或骨髓；④PBS 缓冲液；⑤淋巴细胞分离液；⑥EDTA；⑦胰蛋白酶；⑧纤连蛋白；⑨IMDM、M199 培养基；⑩FBS；⑪VEGF；⑫bFGF；⑬IGF-1；⑭FITC 标记的抗荆豆凝集素抗体；⑮抗人 CD133、CD34、vWF、Tie-2、KDR、CD105、VCAM-1(CD106)、VE-钙黏着蛋白(CD144)、PECAM-1(CD31)、UEA-1 等抗体；⑯DiI 标记的 Ac-LDL；⑰离心管、吸管、培养板等。

4.4.2 $CD133^+$血管内皮祖细胞的分离

(1) 收集正常人外周血，加入不含防腐剂的肝素(终浓度为 20U/ml)；或收集经过抗凝处理的脐带血；或无菌条件下，抽取正常人骨髓。

(2) 用 2~4 倍体积的 PBS 溶液(添加 2mmol/L EDTA)稀释外周血或骨髓细胞悬液；用 4 倍体积的 PBS 溶液(添加 2mmol/L EDTA)稀释脐带血。

(3) 将 35ml 稀释的细胞悬液轻轻叠加到 15ml Ficoll-Paque 细胞分离液上。

(4) 20℃、400*g* 离心 35min。

(5) 收集界面层的单个核细胞，用 PBS 洗涤细胞 2 次，20℃、200*g* 离心 10min。

(6) 将细胞重悬于 300μl PBS 中(所含细胞量≤10^8个)，加入 100μl FcR 阻断剂，混匀。然后加入 100μl 磁珠耦联的 CD133 单克隆抗体，细胞悬液总体积为 500μl，充分混匀，6~12℃孵育 30min。

(7) 用 5~10ml PBS 洗涤细胞 2 次，以去除未结合的抗体。用 500μl PBS(添加 2mmol/L EDTA)缓冲液重悬细胞以备用。

(8) 将分离柱至于磁场中，以 2ml 分离缓冲液冲洗分离柱。

(9) 将标记 CD133 单抗的细胞悬液缓慢贴壁加入分离柱，避免产生气泡，细胞悬液从分离柱下端自然流出。

(10) 用 500μl 分离缓冲液洗涤分离柱，洗掉不能结合到柱上的细胞，共 4 次。

(11) 将分离柱移出磁场，加 1ml 分离缓冲液加压洗脱吸附细胞，即为 $CD133^+$ 细胞。

4.4.3 内皮祖细胞的培养及分化

(1) 纤连蛋白用 PBS 溶解稀释为 1ng/μl 后包被 24 孔板，每孔中加入 100μl，置于 37℃温箱中孵育 2h，临用前吸出多余的液体，用 PBS 洗涤 2 次。

(2) 将富集的 $CD133^+$细胞(1×10^5~2×10^5个/cm^2)接种于纤连蛋白包被孔板中，添加内皮细胞培养液。

内皮细胞培养液：M199 培养基、10% FBS、VEGF 50ng/ml、bFGF 1ng/ml、IGF-1 2ng/ml。

(3) 将细胞置于 37℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养 3~4 周，每 3~4 天更换培养液。

(4) 内皮细胞的纯化及扩增：

a. 0.25 %胰酶消化细胞后，用含 10% FBS 的 IMDM 培养液洗涤细胞 2 次，收集所有细胞(2×10^6~4×10^6 个)重悬于 100μl 上述培养液中，并与 FITC 标记的抗荆豆凝集素(ulex europaeus agglutinin-1，UEA-1)抗体于 4℃孵育 15min。

b. 洗涤细胞 2 次，重悬细胞，添加抗 FITC 的磁珠，4℃孵育 15min。

c. 洗涤细胞，上柱分选出 UEA-1^+ 细胞(具体步骤参考 CD133^+细胞的分选)。

d. 将富集的 UEA-1^+细胞(1×10^5~2×10^5 个/cm^2)接种于纤连蛋白包被孔板中，添加内皮细胞培养液。

e. 将细胞置于 37℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中继续培养 3~4 周，每 3~4 天更换一次培养液。

(5) 内皮细胞的鉴定：

a. 细胞表面标志的检测：0.25 %胰酶(含 1mmol/ L EDTA) 消化培养扩增的内皮细胞，将 2.5×10^5 磁珠分选的 CD133^+细胞或分选后扩增的细胞重悬于 50μl 含 20% FBS 的 RPMI-1640 培养液中，分别加入小鼠抗人 vWF(von willebrand factor)、Tie-2、KDR、CD105、VCAM-1(CD106) 、VE-钙黏着蛋白(CD144)等抗体，阴性对照管不加一抗，4℃孵育 30min，PBS 洗涤细胞 3 次，加入 FITC 标记的兔抗鼠 IgG，4℃孵育 30min；或直接加入 PE 标记的抗人 CD133、CD34 抗体，FITC 标记的抗人 PECAM-1(CD31)、UEA-1 等抗体，阴性对照管加入 PE 或 FITC 标记的同型鼠 IgG，室温孵育 30min；PBS 洗涤细胞 3 次，进行流式细胞仪分析。或使用上述抗体进行免疫细胞化学染色，观察内皮细胞特异标志的表达情况。

b. 乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low-density lipoprotein，Ac-LDL)摄取实验：向贴壁培养的内皮细胞中添加 10μg/ml DiI 标记的 Ac-LDL(DiI-Ac-LDL)，37℃培养 4h。收集细胞进行流式细胞仪分析或用激光共聚焦显微镜观察分析。

(6) 结果：

a. 磁珠分选的 CD133^+ 细胞经流式细胞仪鉴定其纯度为(90±5)%。CD133^+ 细胞中包含的 CD34^+ 细胞的比例为(95±4)%，KDR$^+$细胞的比例为(3±2)%，不含成熟内皮细胞(VWF，VE-钙黏着蛋白等)或成纤维细胞。

b. 细胞形态变化：分离所得的 CD133^+ 细胞接种于纤连蛋白包被的 24 孔板中，第 3~4 天可观察到梭形贴壁细胞，10~14 天出现多个集落，贴壁的梭形细胞开始从集落的边缘出芽长出。培养 3~4 周后，细胞生长逐渐汇合，以长梭形细胞居多，其中散在成片的鹅卵石样细胞。此时细胞扩增了(11±5)倍。这些细胞不表达 CD133，而表达内皮细胞标志，如 VE-钙黏着蛋白、VWE、UEA-1 等。

c. 通过磁珠纯化的 UEA-1^+ 细胞具有较强的扩增能力，继续培养 2~3 周，细胞可扩增(2228±375)倍。这些细胞可表达内皮细胞标志 VWF、UEA-1、CD105、KDR、CD31、CD144 等，不表达 CD45。它们具有内皮细胞的功能——摄取

Ac-LDL。

(李艳华　裴雪涛)

4.5 肌肉干细胞

骨骼肌作为人体中最大的组织，大约占到体重的40%~50%，如能作为细胞供体，则具有其他组织器官无法比拟的便利性和安全性。传统上认为，骨骼肌细胞为终末分化细胞，出生后即不再分裂增殖。然而最近几年的研究显示，成体骨骼肌中含有能分化成多种不同的间质细胞的多能干/祖细胞(Young et al. 2001，Young et al. 1999)，这就提示骨骼肌中存在一个包含不同亚群具有不同分化能力的干细胞池，位于浆膜和基底膜之间的卫星细胞(satellite cell)可能是其中的一个亚群(Zammit et al. 2001)。更进一步的研究发现骨骼肌来源的干细胞不仅能分化成中胚层的细胞，也能分化成神经外胚层的细胞，如神经胶质细胞和神经元(Romero et al. 2002)。更新的研究证明，肌肉中还存在一群具有造血和成肌分化潜能的干细胞，其特点不同于早期发现的卫星细胞，被称作侧群干细胞(Gussoni et al. 1999)。

综上所述，在肌肉组织中广泛存在一群异质的具有自我更新和多向分化潜能的干细胞群，这为今后肌肉损伤，先天性遗传缺陷以及其他退行性疾病的细胞移植修复治疗带来了福音。本节就骨骼肌来源的干细胞和心肌干细胞做一简要介绍。

4.5.1 骨骼肌的发育及成体骨骼肌的特征

提到骨骼肌的再生和骨骼肌干细胞，就不能不涉及到胚胎骨骼肌的发育，事实上，在骨骼肌的再生过程中成体骨骼肌干细胞在一定程度上类似于胚胎骨骼肌的发育。全部的脊柱肌都来自胚胎中胚层的前体细胞，在胚胎发育过程中，中胚层前体细胞向肌细胞系的分化受到其周围组织的调节。生肌细胞系的形成受到生肌调节因子家族(MRF)的激活，尤其受到Myo D和Myf 5等转录激活物的上调。在Myo D：Myf 5双敲除小鼠中可以看到全部骨骼肌均缺失，并且在这些小鼠的躯干和四肢出现由原定的肌肉祖细胞分化而来的非肌肉组织。相反，增加其表达，则增进成肌细胞及肌细胞的分化。MRF主要作用在肌细胞生成的后期，最终单个核的肌细胞互相融合形成多核的合胞体，并逐渐成熟为肌纤维。在肌肉发育过程中，有一个特殊的成肌细胞亚群不分化，而停留在发育中的肌原纤维的表面，这就是处于静息状态的肌肉卫星细胞，而在个体完全成熟以后，骨骼肌则变成一个由不再分裂的多核肌纤维组成的稳定组织(Schmalbruch et al. 2000)。

骨骼肌的基本收缩单位是肌纤维，单个的肌纤维由结缔组织包裹而形成肌束，进一步形成骨骼肌。如同在结缔组织中一样，骨骼肌组织中也富含血管，以供应其功能活动所需的养分。当肌原纤维成熟后，就会同单个的运动神经元接触，形成运动终板这样一个结构，并表达特定的具有引发收缩功能的物质。相对于肌原纤维的收缩特性，运动神经元和成肌细胞的起源均与之有关，其详细的机制尚有待研究。而单个成体骨骼肌纤维

则由不同生理特性的肌原纤维混合而成，这其中包括慢收缩-抗疲劳型和快收缩-非抗疲劳型，二者在某一肌肉中的比例决定了该肌肉的整体收缩特点。虽然肌原纤维具有不同的生理特点，但不同类型的肌原纤维的收缩机制则是相似的，即“滑行学说”，由肌球蛋白丰富的厚肌丝和肌动蛋白丰富的薄肌丝共同完成。厚肌丝在不同水平向薄肌丝发出横桥，横桥滑动牵引薄肌丝向厚肌丝滑动，引起肌肉收缩。结缔组织使收缩的肌原纤维组合成功能单位，通过与骨骼相连的肌腱而引发运动。因此，骨骼肌功能的维持不仅依赖于肌纤维，而且也离不开运动神经、血管和细胞外结缔组织基质的作用，在骨骼肌源性干细胞的修复过程中，除肌原纤维的再生外，血管、神经、甚至细胞外结缔组织的重建亦是重要方面，这也从侧面提示了骨骼肌源干细胞的多向分化能力。

4.5.2 骨骼肌卫星细胞

骨骼肌卫星细胞是一群尚未分化的处于静息状态的单核生肌细胞，存在于哺乳类、鸟类、爬行类和两栖类的肌纤维酸肌膜与基底膜之间。通常情况下，在成体肌肉中，骨骼肌卫星细胞处于静息期，而当肌肉受到损伤时，作为储备细胞群，这类细胞则迅速增殖分化从而导致肌肉的再生和自身的复制。在人体中，每克肌肉组织含有 2×10^5~2×10^{10} 个卫星细胞，在非病理条件下，其转化率接近于零，而在病理条件下则迅速激活转化。

4.5.2.1 卫星细胞的起源和鉴定

卫星细胞的最初起源目前尚不完全清楚，由其形成的生肌细胞系被认为来源于胚胎或胎儿期的成肌细胞系，而胚胎成肌细胞则起源于体节的多能中胚层细胞。对于卫星细胞本身的起源则有两种观点，一种认为其来自体节，另一种认为其来自内皮。体节起源学说来自传统的鸡胚移植研究，其结果提示包括卫星细胞在内的所有生肌细胞系均有一个共同的体节起源(Armand et al. 1983)。而随后的一些研究提示，卫星细胞可能来自胚胎时期的背侧主动脉内皮(Seale et al. 2000)。另外一些实验显示，骨髓来源的生肌细胞也参与了肌肉的再生。最近人们进一步认识到这两种观点并不相互矛盾，事实上，在早期胚胎发育中，主动脉内皮和体节是彼此相邻的，因此不能排除背侧主动脉来源的生肌细胞直接来自体节。当然，这一问题的明确答案，还需要进一步研究证明。

卫星细胞最初是通过其所在位置和形态特征来鉴定的，通过电子显微镜可以清楚地看到卫星细胞位于肌纤维的肌膜和基底膜之间，其形态为不规则星形，胞质含量少，胞核较肌细胞的核小，而其特异性的分子标志则如表 4.2 所示。

表 4.2 卫星细胞标记

分子标记	卫星细胞表达		实验模式
	静息期	增殖期	
细胞表面			
M-cadherin	+/–	+	在体/离体
Syndecan-3	+	+	在体/离体
Syndecan-4	+	+	在体/离体

续表

分子标记	卫星细胞表达		实验模式
	静息期	增殖期	
c-*met*	+	+	在体/离体
VCAM-1	+	+	在体
NCAM	+	+	在体
Glycoprotein Leu-19	+	+	在体/离体
CD34	+/–	+/–	离体
细胞骨架			
Desmin	–	+	在体/离体
转录因子			
Pax7	+	+	在体/离体
Myf5	+/–	+	在体/离体
MyoD	–	+	在体/离体
MNF	+	+	在体/离体
MSTN	+	+/–	在体/离体
IRF-2	+	+	在体
Msx1	+	–	离体

注：MSTN：筒箭毒碱；VCAM-1：血管细胞黏附分子-1；NCAM：神经细胞黏附分子；MNF：肌细胞核因子；IRF-2：干扰素调节因子-2。

4.5.2.2 肌肉源干细胞与肌肉卫星细胞

除了卫星细胞外，是否存在其他来源的细胞参与了骨骼肌的重建呢？起初有人认为成熟骨骼肌纤维的去分化可能参与了肌肉再生，但在哺乳动物体内，骨骼肌的去分化是一个很偶然的事件，缺乏有力的证据。循环中的细胞则有可能参与肌肉的重建，尤其骨髓来源的细胞在此扮演了一个重要角色，这在骨髓移植实验中得以证实。

利用荧光染料 Hoechst 的排除性，可以从骨髓、皮肤和骨骼肌干细胞中分离出侧群细胞(SP)(Gussoni et al. 1999)，证明肌肉来源的侧群细胞是肌肉源干细胞的一部分，而非卫星细胞，这类细胞表达造血干细胞的表面标志 Sca-1，而不表达卫星细胞的任何标志，在体外能分化成造血系，而不分化为生肌细胞。植入肌肉后，肌肉侧群细胞则显现出产生肌细胞和卫星细胞的能力。

另外，Qu-Petersen 等用预种植的方法从骨骼肌中分离出的肌肉源干细胞(MDSC)，具有多向分化潜能(Qu-Petersen et al. 2002)，表现出比卫星细胞更为强大的肌肉再生能力，并可从中分出不到 1%的侧群细胞。同时，Asakura 等也发现卫星细胞除了生肌分化以外，还具有成骨和成脂分化能力。因此，目前尚不清楚 MDSC 和肌肉卫星细胞是否是同一群细胞因为不同分离技术而造成的结果，还是同一群细胞的不同成熟阶段。

4.5.2.3 骨骼肌卫星细胞的分离和培养

体外骨骼肌卫星细胞的分离方法较多，这里简要介绍人骨骼肌组织的密度梯度离心法来分离培养卫星细胞。

(1) 无菌切取人骨骼肌，尽量去除血管、脂肪和筋膜。

(2) 在 4℃预冷的 Hank 缓冲液中清洗 3 遍。

(3) 用剃须刀片将肌肉组织切成 1mm×1mm×1mm 大小的方块。

(4) 在 37℃条件下，用 0.125 %胰酶和 0.1 %胶原酶 II 联合消化 2h，并轻轻摇晃。

(5) 200 目筛网过滤，除去未消化的组织块。

(6) 将滤液 200*g* 离心，并用 1×PBS 重悬。

(7) 将重悬细胞液缓慢加入密度为 1.073g/ml 的 Percoll 中 900*g* 离心 20min。

(8) 取界面分离出的骨骼肌卫星细胞，用 10ml DMEM 洗净重悬，细胞计数，按 1×10^5 个/ml 密度接种于含有 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基、表面铺有 1% I 型胶原的培养皿中，置于 37℃、5% CO_2 培养箱培养。

(9) 约 7~10 天后，细胞长至 70%汇合时按 1 传 2 的比例传代。

注意：①在体切取肌肉时不能使用电凝止血；②所取肌肉组织块不宜过小，一般不要低于 50g；③成体肌肉干细胞为有限增殖，一般不超过 3 月，7~10 天增殖 1 倍；④肌肉干细胞数量随年龄升高而下降，供体越年轻越好；⑤培养基条件及生长因子是重要因素，视具体实验要求而定。

4.5.3 骨骼肌源干细胞的分离培养

这里仅介绍经典的预种植技术(preplate technique)，该方法主要利用肌肉源干细胞和成纤维细胞、内皮细胞等的黏附性的差异来将 MDSC 分离，下面以大鼠为例予以介绍。

(1) 实验动物：3~8 周龄 SD 大鼠。

(2) 无菌条件下切取大鼠后肢腓肠肌，用眼科剪剪碎。

(3) 在 37℃条件下，依次用以下 3 种酶消化：0.2%胶原酶 XI 消化 1h，0.3% dCTP 酶消化 45min，0.1% 胰酶消化 30min。

(4) 消化后的细胞悬液置于I型胶原酶包被的培养皿中，培养基为含 10 % 胎牛血清，10% 马血清，0.5% 鸡胚提取物及 1% 青链霉素的 DMEM 培养基。

(5) 1h 后，将未黏附的悬浮细胞转移到第 2 瓶中，第 1 瓶中再加入新鲜培养基，即为 pp1(preplate1)；第 2 瓶在培养 24h 后，悬浮细胞转至第 3 瓶；第 3 瓶在培养 24h 后，悬浮细胞转至第 4 瓶；直至第 6 瓶，时间间隔均为 24h。即可获得从 pp1 到 pp6 逐步纯化的 MDSC。其中 pp1~pp4 称作前期种植细胞(early plate，EP)，pp5~pp6 称作后期种植细胞(late plate，LP)。

(6) MDSC 的免疫组织化学鉴定：具体方法参考 4.3.2。

MDSC 一般为 $CD34^+$、$Sca\text{-}1^+$、$desmin^+$、$CD45^-$。

4.5.4 骨骼肌源干细胞的分化

骨骼肌源干细胞具有多向分化潜能，除能向骨骼肌、心肌和平滑肌分化外还能向神经、成骨和造血系分化，下面分别给予介绍。

4.5.4.1 骨骼肌分化

(1) 肌源性干细胞的分离参照前述的预种植方法。

(2) MDSC 按 1×10^5 个/ml 的密度种植于铺有 1%的 I 型胶原酶的培养皿中。

增殖培养基：低糖 DMEM、20% FCS、15% HS(human serum，人血清)、6ng/ml 重组人碱性成纤维生长因子 rh bFGF、100U/ml 青霉素、100μg /ml 链霉素。

(3) 37℃、5%CO_2 培养箱培养，每 24h 加入 6ng/ml rh bFGF。

(4) 每 3 天换液一次。

(5) 7~10 天按 1 传 2 传代。

(6) 在 5~10 代时进行诱导分化。

诱导培养基：低糖 DMEM、7.5% HS、6μg/ml 胰岛素。

(7) 7 天后即可见相互融合的肌管形成和表达横纹肌肌动蛋白和 $desmin^+$ 的骨骼肌纤维。

4.5.4.2 平滑肌分化

这里介绍一种共培养的方法诱导大鼠 MDSC 向平滑肌的分化。

(1) 大鼠 MDSC 采用预种植技术分离 3~8 周龄的 SD 大鼠的后肢。

(2) 平滑肌细胞取自提供 MDSC 大鼠的膀胱，无菌切取大鼠膀胱，用眼科镊和眼科剪逐步分离除去膀胱内外侧的黏膜层和浆膜层，用剃须刀片将平滑肌层切碎，37℃条件下，用 0.25%的胰酶(含 0.02% EDTA)消化 1h，100 目筛网过滤除去组织块，细胞悬液 200*g* 离心 5min，弃上清液。

(3) 将大鼠膀胱平滑肌细胞和 MDSC 共培养于 I 型胶原酶包被的培养皿中。

培养基：低糖 DMEM、10% FCS、10% HS、0.5%鸡胚提取物、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素。

(4) 平滑肌细胞的鉴定通过免疫组织化学检测α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)。

4.5.4.3 成骨分化

(1) MDSC 分离同前，采用预种植方法。

(2) 培养条件：采用增殖培养基。

增殖培养基：低糖 DMEM、10% FCS、10% HS、0.5%鸡胚提取物、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素。

(3) 诱导剂为 200ng/ml 的人重组骨形成蛋白-2(rhBMP-2)，每 3 天换液一次，37℃、5% CO_2 培养箱中培养。

(4) 培养1周后即可见具有成骨细胞系标记骨钙素(osteocalcin)阳性的细胞增多。同时，可通过反复冻融使细胞裂解，检测碱性磷酸酶(ALP)活性来判定成骨转化。

4.5.4.4 神经细胞分化

(1) MDSC 分离同前，采用预种植方法。

(2) 培养条件：采用诱导培养基。

诱导培养基：DMEM/F12、20μg/L rhEGF、10μg/L bFGF、2mmol/L *L*-谷氨酰胺、33mmol/L 葡萄糖、9.26g/ml 腐胺、6.3μg/L 孕酮、5.3μg/L 亚硒盐、0.0025g/L 胰岛素、0.1g/L 转铁蛋白、100U/ml 青霉素、100μg /ml 链霉素。

(3) 培养约 10 天后，即可见到表达相应神经标记物的神经元样和神经胶质样细胞。

4.5.4.5 造血系分化

(1) MDSC 分离同前，采用预种植方法。

(2) 将 1×10^6 个 MDSC 种于 10cm 的组织培养皿中，37℃、5% CO_2 培养箱培养。

诱导培养基：MEM、10% HS、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素，每 2 天加入 5ng/ml 干细胞生长因子(SCF)和白细胞介素-6(IL-6)，或 5ng/ml SCF、Flt-3L 和巨核细胞生长发育因子(MGDF)。

(3) 培养10天后即可见带有造血系细胞标记的分化细胞，如造血干细胞标记 C-kit 阳性细胞出现，可用流式细胞仪检测。

至于骨髓源干细胞向心肌细胞的分化，目前尚存在一定争议，这里不作详细介绍。相信除以上介绍的分化途径以外，还有其他很多方法可用于 MDSC 的分离和诱导分化，因此需要依据实验目的和实验对象的不同加以选择。由于 MDSC 是一种异质细胞群，目前其详细的组成还不清楚，具体实验时还要进行条件的优化和摸索，以上方案仅供参考。

4.5.5 心肌干细胞

对于心肌干细胞，目前人们了解得还不是很清楚，传统观念认为成年心肌细胞属于终末分化细胞，不能再次进入细胞周期，而是停止在 G_0 期，不再进行有丝分裂，成年心肌细胞核中也很难发现有丝分裂相，从而使出生后的心肌细胞数目保持不变。实际上，在成年后的心脏中很难检测到 DNA 的合成，临床上也少见原发于心脏的肿瘤。

但是，随着近年来研究的不断深入，实验技术的不断提高，心肌细胞被看作终末分化细胞这一传统观念受到了极大的挑战。最近的研究证实在啮齿类和人类成体心脏中存在心脏干细胞，这些未分化的早期细胞可表达干细胞标记 Sca-1、c-Kit 和 mdr-1，以及保持端粒酶活性，而端粒酶是一种逆转录酶，存在于分裂期的细胞，不存在于静止期或终末分化细胞中，其主要作用是合成 DNA 的末端重复序列，阻止染色体末端的丢失。Kjastura 等(Kjastura et al. 1998)通过共聚焦显微镜观察发现，在正常人心脏中每一百万个心肌细胞大约有 14 个处于有丝分裂相；而在缺血性心脏病的后期及自发性扩张性心肌病的心肌细胞中，处于有丝分裂相的心肌细胞分别达到 152 个/百万及 131 个/百万，相当于正常的 10 倍左右。他们还发现成年大鼠心衰时心肌细胞可以再次进入细胞周期，这是由于过度负荷的心脏受到某些生长因子的刺激的结果，如胰岛素样生长因子 1(IGF-1)。以上结果提示，成熟的心肌细胞并非完全处于 G_0 期而不能分化。Quaini 等(2002)将 8 名女性心脏移植给 8 名男性心脏病患者，结果发现源于女性移植心脏的心肌细胞、冠状动脉、静脉中 7%~10%具有 Y 染色体，并有高度的增殖能力。这些细胞缺乏骨髓来源细胞的标志，可表达心肌细胞标志 MEF-2、GATA-4 和内皮细胞标志 K1k1，移植后的干细胞表面相关抗原的表达明显增多，这就提示心脏可能存在少量的心肌干细胞。Matsuura 等(2004)用免疫磁珠分离法分离培养小鼠心脏 Sca-1$^+$细胞，经催产素(oxytocin)诱导后使其

表达心肌转录因子和收缩蛋白的特异性基因，出现肌管结构和自发性搏动，并可诱导其分化为成骨细胞和脂肪细胞。

以上结果表明，心脏中可能存在有心肌干细胞，并具有增殖和分化为包括跳动性心肌细胞在内的多种细胞的潜能，这就为一些心脏疾病的细胞治疗带来了希望。尤其对于某些严重危害人类健康的心脏疾病，如心肌梗死。由于供体心脏的严重匮乏，致使成千上万的心肌梗死患者在等待中死亡。20 世纪 90 年代以来，众多研究者先后应用啮齿类和猪胚胎、胎儿和新生儿心肌细胞、胎儿平滑肌细胞、AT-1 肿瘤细胞、成人与胎儿心肌细胞、成人自体心室心肌细胞，真皮成纤维细胞等作为供体细胞，进行细胞移植治疗心肌梗死的动物模型试验，已取得了较好的进展，移植的细胞具有舒缩功能，能引起心血管再生。尽管还存在诸如免疫排斥、伦理道德方面的难题，但移植心肌细胞仍不失为治疗重型心肌坏死的一个替代途径。干细胞为治疗心血管疾病提供了新的种子细胞来源和思路。

心肌干细胞的提出，不仅为心脏疾病的细胞治疗开辟了途径，也为以心肌干细胞为靶细胞的基因治疗或通过细胞因子激活自体心肌干细胞的治疗途径提供了思路。但心肌干细胞是否确实存在尚存疑义(Quaini et al. 2002，Orlic et al. 2002)。心肌干细胞的来源、大量获取以及分离培养方法还需要进一步深入研究。值得注意的是，G-CSF、SCF、IGF1、VEGF 等细胞因子可能直接刺激造血干细胞、MSC、血管内皮细胞或心肌干细胞的活化，转分化为功能性心肌细胞，增强心脏功能，改善血液循环，从而达到治疗心脏疾病的目的，这有可能成为心脏疾病治疗的捷径。

(苏　平　裴雪涛)

4.6　肝脏干细胞

慢性肝炎、肝硬化、门脉高压症、原发性肝癌、遗传性及代谢性肝脏疾病等诸多难治性肝病是全世界共同面临的棘手问题，对于以上各种原因引发的终末期肝衰竭，原位肝移植是目前唯一有效的治疗手段。然而，由于供肝的极度短缺、手术及移植本身相关的较高死亡率、终身服用免疫抑制剂及其所带来的严重甚至致命的并发症使得肝移植在临床的广泛应用受到极大限制。

干细胞是人体及各种组织细胞的最初来源，具有高度自我更新和多向分化潜能及可植入性、可重建性等特征。随着干细胞生物学研究的不断深入，以干细胞为种子细胞的细胞移植治疗将为终末期肝衰竭患者带来新的希望。而可以作为肝脏干细胞来源的干细胞有如下几种：①胚胎干细胞；②肝脏和胰腺来源的肝脏干/祖细胞；③唾液腺祖细胞；④胎肝中的肝脏干细胞；⑤骨髓来源的肝脏干细胞(bone marrow derived hepatic stem cell，BDHSC)。而且在肝脏发育过程中，很多细胞因子和生长因子都参与了肝脏干细胞的增殖分化，如 HGF、FGF、OSM、表皮生长因子(EGF)等细胞因子和干细胞因子(SCF)等生长因子，此外，肝脏微环境中 Jagged/Delta 和 Notch 受体的相互作用、胆管反应细胞上神经/内分泌表面抗原(包括 M 受体等)也可能在细胞分化中发挥作用。肝脏干细胞较成熟肝脏细胞的优点在于其易于扩增培养，免疫原性较弱，尤其是胚胎组织来源的干细胞，

体外培养条件下易于操作，因此可通过体外扩增，分化和基因修饰后，然后再进行体内移植，现在已经有成功进行肝脏遗传代谢性疾病和继发性肝功能衰竭肝脏细胞移植的个例报道。近年来，伴随细胞生物学和分子生物学的进步，肝脏干细胞移植在理论与技术方面均取得了很大进展。以供体肝脏干细胞作为载体的直接肝基因治疗是肝脏细胞移植基础与临床研究的一个热点，即通过逆转录病毒、腺病毒将目的基因体外转染至分离的供体肝脏干细胞中，再进行肝脏细胞移植，移植后的供体肝脏干细胞就可以在受体中表达目的基因，从而达到治疗的目的。

本实验对胚胎肝脏以及骨髓来源的特定亚群干细胞在体外进行扩增与定向诱导分化，以及对分化出来的肝脏干细胞进行体外形态学及其功能的鉴定进行研究和探讨，为肝脏细胞移植提供理想的供体肝脏细胞来源和实验基础。

4.6.1 胚胎肝脏干细胞的分离培养扩增与定向诱导分化

与成熟的肝脏、胰腺和唾液腺相比，胎肝脏中干/祖细胞比例更高，更为原始，具有更强的增殖分化潜能，免疫原性相对较弱。Malhi 等(2002)从 17~24 周孕龄的人胎肝中分离出的大量上皮祖细胞具有很强的克隆形成和增殖能力，体外传 40 代以上仍保持正常核型，表达卵圆细胞特有的表面标志，将原代培养及体外扩增的细胞移植入 CCl_4 损伤的重症联合免疫缺陷(severe combined immune deficiency，SCID)小鼠体内后，能整合入受体肝脏实质，并且可向成熟肝脏细胞分化。用 FACS 方法从孕龄 13.5 天的小鼠胎肝脏中分选出的 c-Met^{+}CD49f$^{+/low}$c-kit^{-} CD45^{-} TER119^{-} 细胞具有高度的自我更新和多向分化潜能，当细胞分别经脾、胆总管及十二指肠壁移植入受体小鼠后，该种细胞可分别向肝脏细胞、胰腺上皮细胞和肠上皮细胞分化(Suzuki et al. 2002)。

以大鼠胎肝细胞的分离培养为例，此外用 OX43/44 抗体免疫吸附法去除胎肝中的造血干细胞(徐国权 2001)，获得较为纯化的胎肝细胞，并对纯化后的胎肝细胞在体外进行培养扩增与定向诱导分化。

4.6.1.1 实验所需仪器及材料

(1) 纯系 SD 大鼠——成年雄性大鼠(体重 200±20g)及孕 15、18、20 天成年雌性大鼠。

(2) 主要试剂：I 型胶原酶(collagenase type I)，小鼠抗大鼠 OX43/OX44 抗体，羊抗小鼠 IgG 血清，DMEM 培养基、F12 培养基，兔抗大鼠白蛋白单抗，胎牛血清，淋巴细胞分离液($\rho = 1.083$)，HEPES，胰高血糖素(glucagon)，胰岛素(insulin)，氢化可的松(hydrocortisone)，转铁蛋白(transferrin)，表皮生长因子(epidermal growth factor)，硒酸盐(sodium selenate)，尼克酰胺(nicotin-amide)，亚油酸(linoleic acid)，醋酸维生素 E(a-tocopherol acetate)，维生素 C，甘氨酸(glycine)，甲状腺素(triidothyronine，T3)等。

(3) 一次性无菌离心管，细胞培养板、细胞培养皿、培养瓶等。

4.6.1.2 方法

1) 孕周确定方法

采用 12h 昼/12h 夜饲养周期，一雌二雄同笼过夜，次晨雌鼠阴道分泌物涂片检查，

有阴栓出现确定为妊娠雌鼠，孕周为0天。孕15、18、20天雌性SD大鼠行剖宫产术取胎鼠。

2) 胎肝细胞分离

(1) 手术方法:怀孕雌性SD大鼠术前12h禁食，4h禁水。动物称重后按照30mg/kg肌肉注射0.3%戊巴比妥钠溶液,麻醉后仰卧固定于动物手术台,8%硫化钠腹部脱毛备皮，乙醇、碘伏消毒后铺无菌孔巾。取下腹正中切口，长约4cm，进腹。可见怀孕大鼠为双子宫，肌层透明，胎鼠清晰可见，依次排列，7~12只数目不等。分离子宫各韧带后将双子宫完整切除，置于含4℃ Hank缓冲液无菌培养皿中，母鼠依次缝合关腹。

(2) 分离方法：将盛有子宫的无菌培养皿转移至超净工作台冰浴盒上操作，剪开子宫肌层及胎膜，去除胎盘脐带，Hank缓冲液洗净羊水及血液。剪开胎鼠腹壁，完整取出胎肝，去除胆囊后用Hank缓冲液洗净血液，手术刀切割成1mm×1mm×1mm大小的组织块，置于15ml无菌离心管中。

(3) 无菌离心管加入0.05%胶原酶缓冲液，比例为0.1g/ml，将无菌离心管置于37℃温水浴振荡箱中振荡15min，频率50次/min。无菌100μm尼龙滤网过滤2次，未消化组织块在无菌细胞培养皿中用无菌玻璃试管底机械法研磨为组织匀浆，加入Hank缓冲液过滤，过滤后胎肝组织悬液低温离心机离心2min，转速1200r/min。细胞沉淀用Hank缓冲液重悬，重复上述操作一次。最后加入Hank缓冲液制成单细胞悬液。台盼蓝活性检测，细胞计数。

3) 胎肝细胞纯化

(1) 将分离的胎肝细胞悬液按体积比 1∶10 的比例加入红细胞裂解液，置于无菌离心管中，低温机离心3min，转速1200r/min。

(2) 离心后小心去除上清，用含OX43抗体(15μg/ml)、OX44抗体(18μg/ml)的完全培养基DMEM 2ml加入到无菌离心管，将细胞沉淀重悬，吸附造血干细胞，4℃静置10min。

(3) 同时将羊抗小鼠IgG血清稀释10倍，取10ml平铺于90mm无菌培养皿B中，使之完全覆盖培养皿底，室温孵育40min。

(4) 磷酸盐缓冲液漂洗无菌培养皿3次,用含1%胎牛血清的Hank缓冲液漂洗1次。

(5) 将无菌离心管A(含胎肝细胞)中的纯化培养基小心加入含羊抗小鼠IgG血清无菌培养皿B中，4℃静置10min。将造血干细胞免疫吸附沉淀到无菌培养皿B底部。

(6) 无菌巴斯德吸管小心吸取无菌培养皿B中的上清，内含未被吸附的细胞，用磷酸盐缓冲液小心漂洗培养皿3次，收集上清及漂洗液，低温离心2min，转速1200r/min。获得的细胞沉淀即为纯化后的胎肝细胞。

(7) 2ml Hank缓冲液重悬细胞沉淀，细胞计数，台盼蓝活性鉴定。

4.6.1.3 纯化胎肝干细胞培养

1) 条件培养基的配制

胰高血糖素100ng/ml，胰岛素10μg/ml，转铁蛋白10μg/ml，氢化可的松60ng/ml，甲状腺素 50nmol/L，表皮生长因子 25ng/ml，硒酸钠 5ng/ml，甲状腺素，尼克酰胺10mmol/L，亚油酸50ng/ml，醋酸维生素E 1μg/ml，维生素C 0.1mmol/L，其他成分同普

通培养基。

2) 条件培养液体外诱导胎肝干细胞定向分化

将分离富集的胎肝细胞浓度稀释为 1×10^6 个/ml，取 0.5ml 接种于 24 孔培养板($2cm^2$/孔)，接种密度为 2.5×10^5 个/cm^2，加入 1.5ml 条件培养基。培养条件 37℃、5% CO_2。培养 18~20h 后 Hank 缓冲液冲洗后去除未附壁的胎肝细胞，更换培养基。以后每 24h 更换一次培养基。

4.6.2 骨髓来源肝脏干细胞的分离培养扩增与定向诱导分化

骨髓来源的干细胞具有多向分化潜能。特别是具有向肝脏干细胞、肝脏细胞及血管内皮细胞分化的潜能(Ferrari et al. 2000)，加之其具有来源丰富，取材方便，操作技术相对成熟，源于自体，无免疫排斥问题等优势，因而有望成为肝脏组织工程或肝脏再生细胞治疗中新的种子细胞来源。自1999年首次发现大鼠的骨髓细胞可以分化为肝脏卵圆细胞，并进而分化为肝脏细胞和胆管上皮细胞以来，不断有研究结果支持这一观点。然而也有一些研究提出了骨髓源性干细胞在肝内与肝脏细胞融合的证据，认为肝内出现的新标志细胞是植入细胞与受体肝脏细胞的融合而不是由干细胞转分化而来。有报道在对初始细胞状态、分化环境等严格控制的条件下，证明骨髓干细胞可以转分化为肝脏细胞而没有发生细胞融合，当骨髓干细胞与损伤的肝组织(或细胞)在分隔的体系中共培养时，损伤肝脏组织(或细胞)分泌的因子刺激了干细胞向肝脏细胞分化的潜能，但由于骨髓干细胞不与肝脏组织直接接触因此排除了细胞融合的可能性，并且骨髓干细胞在移植入肝脏损伤大鼠体内后，随着肝组织损伤程度的增加，干细胞转化为有活性的肝脏细胞，肝脏功能在细胞移植后 2~7 天将得以恢复(Jang et al. 2004)。

迄今为止，人们把骨髓中存在的干细胞分为 3 类(尽管 3 类细胞之间在界定上有不同程度的不确定及交叉)：造血干细胞(hematopoietic stem cell，HSC)，间充质干细胞(mesenchymal stem cell，MSC)和多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cell，MAPC)。骨髓内含有如此多种细胞类型，具体是哪种细胞群体能分化为肝脏细胞，目前各家报道尚不一致，这将涉及多个细胞表面标记，既有造血系细胞，又有间质系细胞，因此寻找可以纯化的骨髓源性肝脏干细胞的确切的表面标记显得尤为重要。β_2 微球蛋白(β_2M)是哺乳动物体内广泛表达于有核细胞表面、最具保守性的蛋白质，由于其不出现于某些永生性生长的肿瘤细胞及囊胚期 ES 细胞表面，因此β_2M^-细胞被认为是具有旺盛增殖潜能的细胞；此外，骨髓中造血干细胞表面标志 Thy-1^+细胞具有向成熟肝脏细胞分化的潜能。故推测，骨髓来源的 Thy-1^+ β_2M^- 细胞(bone marrow derived Thy-$1^+\beta_2M^-$ cell，BDTC)可能是骨髓中的肝脏干/祖细胞(Avital et al. 2001)。

本实验采用两步间接免疫磁珠分选的方法得到骨髓中表面标志 Thy-$1^+\beta_2M^-$的细胞，并通过添加因子直接培养的方法以及 Transwell 体系共培养的方法诱导骨髓来源肝脏干细胞进行体外定向诱导分化。

4.6.2.1 两步间接免疫磁珠分选(MACS)技术获得大鼠 BDTC(图 4.25)

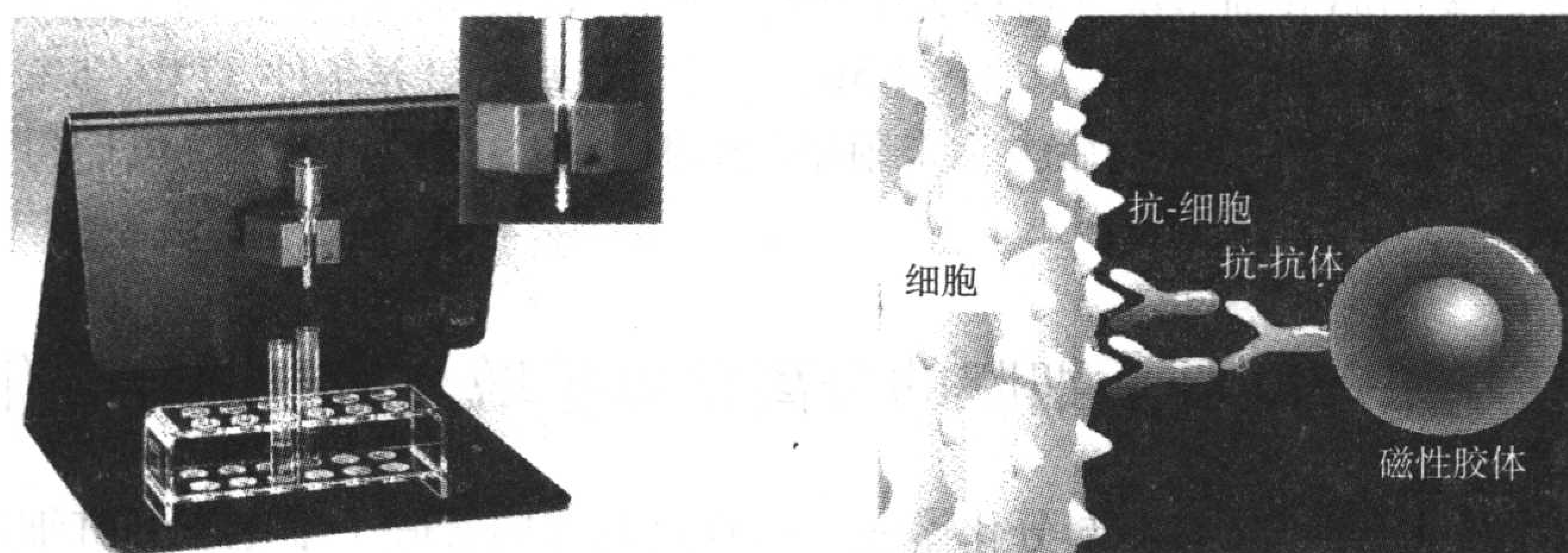


图 4.25 MACS 细胞分选系统及其工作原理示意图

1) 实验所需仪器及材料

①近交系 Fisher344 大鼠；②大剪刀以及小剪刀(各 2 把)，镊子(2 把)，无菌托盘；③全自动高速冷冻离心机；④超净工作台；⑤普通光学显微镜；⑥胎牛血清，DMEM 培养基；⑦MACS 磁性分离仪、分离柱；⑧MACS 磁性细胞分离试剂盒(抗 CD34 抗体、磁珠)；⑨PBS 缓冲液；⑩200μm 钢筛网；⑪ 10ml 离心管，吸管，100mm 组织培养皿，纱布；⑫ 一次性 5ml、10ml 注射器；⑬ 羊抗兔 IgG 标记的免疫磁珠；⑭ 兔抗大鼠 Thy-1、β_2M 多克隆抗体；⑮ 淋巴细胞分离液(Ficoll，$\rho = 1.083$g/ml)。

2) 大鼠骨髓来源的 Thy-1$^+\beta_2$M$^-$细胞分离方法

(1) 准备近交系 Fisher344 大鼠，体重 150~180g，饲养于清洁级、22℃恒温鼠房，12h 交替照明，自由进食和饮水，实验前 2 天单独喂养；

(2) 将 F344 大鼠断颈处死，70%乙醇浸泡 10min 清洗消毒后置于无菌托盘内；

(3) 无菌条件下剥皮，分别从大鼠的肩关节和髋关节处解剖四肢，切除爪，取出四肢骨放入盛有 PBS 的 100mm 组织培养皿中，反复冲洗四肢骨表面残留血细胞，将冲洗干净的四肢骨移入另一含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液的 100mm 组织培养皿中，使用剪刀镊子断离两侧骨骺，通过 5ml 注射器用完全培养液反复冲洗骨髓腔以及富含骨髓细胞的骨骺，尽量将骨髓细胞完全冲出；

(4) 将冲出的骨髓细胞经 200 目筛网过滤后，重悬于培养液中形成细胞悬液，然后在无菌 10ml 离心管中加入 5ml 淋巴细胞分离液，再缓慢沿管壁加入 5ml 细胞悬液，20°C、1500r/min 离心 20min，分离出单个核细胞；

(5) 收集中间的单个核细胞层，用 DMEM 培养液离心(1500r/min、5min)洗涤 2 次；

(6) 加入兔抗大鼠β_2M 抗体 10 μl 轻轻混匀后，4℃孵育 30min，1500r/min 离心 5min，PBS 洗 2 次；

(7) 加入磁珠标记的羊抗兔 IgG，4℃孵育 30min，1500r/min 离心 5min，PBS 洗 2 遍；

(8) 将分离柱固定于 MACS 磁场内，用除气的 MACS 缓冲液(真空抽气)2ml 冲洗分离柱；

(9) 将单细胞悬液缓慢贴壁加入分离柱，避免产生气泡，以 2ml 除气的 MACS 缓冲

液洗涤，收集洗脱组分，2000r/min 离心，弃上清，得到β_2M^-细胞；

(10) 将收集到的β_2M^-细胞再先后与兔抗大鼠 Thy-1 抗体和磁珠标记的羊抗兔 IgG 4℃孵育；

(11) 细胞洗涤后经 MACS 高梯度磁场分选，Thy-1^+细胞被 MACS 缓冲液冲出；将磁性分离柱移离磁场，用缓冲液洗脱滞留于分离柱内的细胞，得到大鼠骨髓来源的 Thy-$1^+\beta_2M^-$细胞(BDTC)，台盼蓝染色检测细胞存活率大于 95%，细胞置 4℃备用。

注意：以上操作均严格按照无菌操作规程。

4.6.2.2 骨髓来源肝脏干细胞(BDHSC)的培养扩增与定向诱导分化

骨髓来源肝脏干细胞的增殖分化主要受到细胞因子和(或)生长因子的调控。研究表明，抑瘤素(oncostatin M，OSM)、表皮生长因子(EGF)、FGF、肝脏细胞生长因子(HGF)等在肝脏损伤后修复和再生的不同时期均发挥一定的作用(Jauregui et al. 1999)。采用特定肝脏细胞培养液，以 HGF 和 EGF 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向肝脏细胞样细胞定向分化。

4.6.2.2.1 直接法诱导骨髓 Thy-1^+ β_2M^- (bone marrow derived Thy-1^+ β_2M^- cell, BDTC) 的细胞向肝脏细胞分化

1) 实验所需仪器及材料

①胎牛血清，高糖 DMEM 培养基；②全自动高速离心机；③10ml 离心管，吸管；④Hepes；⑤地塞米松；⑥表皮生长因子(EGF)，肝脏细胞生长因子(HGF)；⑦6 孔培养板；⑧超净工作台；⑨胰蛋白酶；⑩Matrigel。

2) 骨髓来源肝脏干细胞的诱导分化

将收集的大鼠 BDTC1×10^4 个/孔的密度接种于铺有 2mg/L Matrigel 的 6 孔培养板中，条件培养液为高糖 DMEM，其中含 10%胎牛血清、20mmol/L Hepes、10^{-7} mol/L 地塞米松、20μg/L HGF、20μg/L EGF 及部分微量元素和青链霉素，隔日半量换液 1 次。

4.6.2.2.2 Transwell 体系共培养诱导骨髓 Thy-$1^+\beta_2M^-$细胞向肝脏细胞分化

有证据显示肝脏损伤后释放的大量促进肝再生的可溶性细胞因子及生长因子等构成了适宜的微环境(Gonzalez-Reyes et al. 2003)，所以我们通过利用 Transwell 体系共培养 BDTC 和丙烯醇(allyl alcohol，AA)损伤的肝脏细胞，并且添加适当细胞因子和生长因子，在体外通过细胞工程的方法，创造适于干细胞增殖和向肝脏细胞分化成熟的环境，以骨髓干细胞作为种子细胞，大量生产有功能的肝脏细胞。

1) 灌注法 AA 损伤肝脏细胞悬液的制备的材料

①9~10 周龄、体重 150~170g 的 Wistar 大鼠；②输出速度为 4~60ml/min 的蠕动泵；③硅胶管(0.078 ID×0.125OD)；④外科手术器械(大、小组织剪、镊子、止血钳、18 号套管针、4 号手术丝线、棉球、纱布等)；⑤75%乙醇；⑥戊巴比妥钠(sodium pentobarbital)；⑦80 目微孔滤膜；⑧细胞培养基(RPMI1640、10% FCS、10^{-7}mol/L 地塞米松、10μg/ml 胰岛素、5ng/ml 转铁蛋白)。

2) 灌注法 AA 损伤肝脏细胞悬液的制备

(1) 提前 24h 经腹膜内注射 AA 0.62mmol/kg，建立急性肝衰竭模型。

(2) 用 500ml 无菌水灌注管道，调整蠕动泵的流速为 16ml/min。

(3) 腹膜下注射 0.2ml/200g 戊巴比妥钠麻醉大鼠，固定并消毒大鼠，以 EGTA 溶液

灌注管道。

(4) 在一对止血钳的配合下，沿正中线从耻骨到胸骨打开腹腔，沿切口的中线做水平切口，充分暴露腹腔；以蘸 EGTA 的棉球将肠管推开，暴露肝脏；轻轻上翻肝叶，暴露门静脉和下腔静脉；在右肾静脉分支上方用丝线将腔静脉打一活结；分别在离肝脏较近和较远处的门静脉下方置两根丝线；在眼科镊子的协助下进行门静脉穿刺，穿刺点位于距进入肝叶的静脉分支约 1.5cm 处。操作过程注意保持套管针与门静脉的平行以免刺破血管后壁，拔除套管针后立即打双结，将管道连接至套管，开始灌注。

(5) 在肾脏下方切断腔静脉，肝脏立即变白；入胸腔切断腔静脉。扎紧肾脏上方的腔静脉，用纱布吸净胸腔内的积血/液。

(6) 继续灌注 EGTA 液体 4min，停泵；换 1×Leffert 缓冲液，灌注 2min，停泵；加入消化液灌注，直至肝脏裂开，停泵；除去胸腔内的积液。

(7) 用消过毒的止血钳和剪刀切下消化理想的肝叶部分放入培养皿中；向消化的肝叶加入冰冷的 $CaCl_2$ 溶液，用 2 把解剖刀分离肝叶。

(8) 在橡皮细胞刮子的协助下，用 80 目滤网及漏斗过滤细胞至 150ml HBSS 平皿内，将细胞转移至 50ml 离心管中，50*g* 离心 1~4min；用清洗缓冲液重悬细胞，洗 3 次；以 10~20ml $CaCl_2$ 溶液重悬细胞。

(9) 向 80μl HBSS 中加入 10μl 细胞和 10μl 0. 4%台盼蓝，在显微镜下观察细胞活力。

4.6.2.2.3 BDTC 诱导体系的建立

1) 材料与方法

(1) DMEM/F12 完全培养液。

(2) 条件培养液：向完全培养液中加入 1×ITS、尼克酰胺 0.61g/L、地塞米松 0.1μmoL/L、牛血清白蛋白(BSA)2g/L、葡萄糖 1g/L、半乳糖 2g/L、鸟氨酸 0.1g/L、脯氨酸 0.03g/L、谷氨酰胺 0.73g/L 及适量微量元素(氯化锌、硫酸锌和氯化锰)等。

(3) 细胞因子和生长因子：hHGF 和 bFGF。

(4) Transwell 培养板。

(5) Matrigel。

2) 细胞培养的放置

将从灌注法中获取的 AA 损伤的肝脏细胞按 3×10^4 个/cm^2 接种于铺有 I 型鼠尾胶原的 Transwell 培养板上室，将 BDTC 按 5×10^4 个/cm^2 接种于铺有 Matrigel 的下室(图 4.26)。

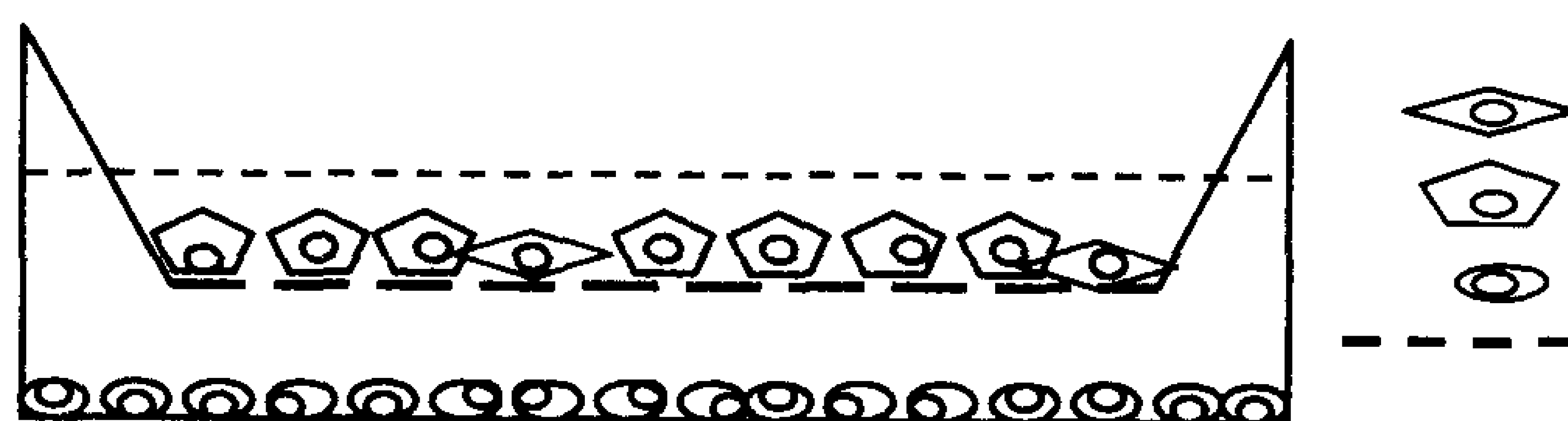


图 4.26　由 Transwell 培养板构建的共培养体系示意图

3) 细胞培养及观察

细胞常规培养(37℃、5% CO_2 孵箱)于条件培养液，隔天半量换液。在同样培养条件下，以上室接种相同量正常大鼠的肝脏细胞作为对照，于相差显微镜下动态观察细胞形

态的变化。

4.6.2.2.4 检测方法

1) 普通光镜观察

在 BDTC 与 AA 损伤肝脏细胞共培养体系的下室中，接种的部分 BDTC 于诱导第 7 天体积明显增大，核浆比例大，出现大而圆的单个、双个甚至多个细胞核，细胞质丰富，部分细胞处于分裂相；相反，BDTC 与正常肝脏细胞共培养组及单独培养时均未见其形态发生变化(图 4.27)。

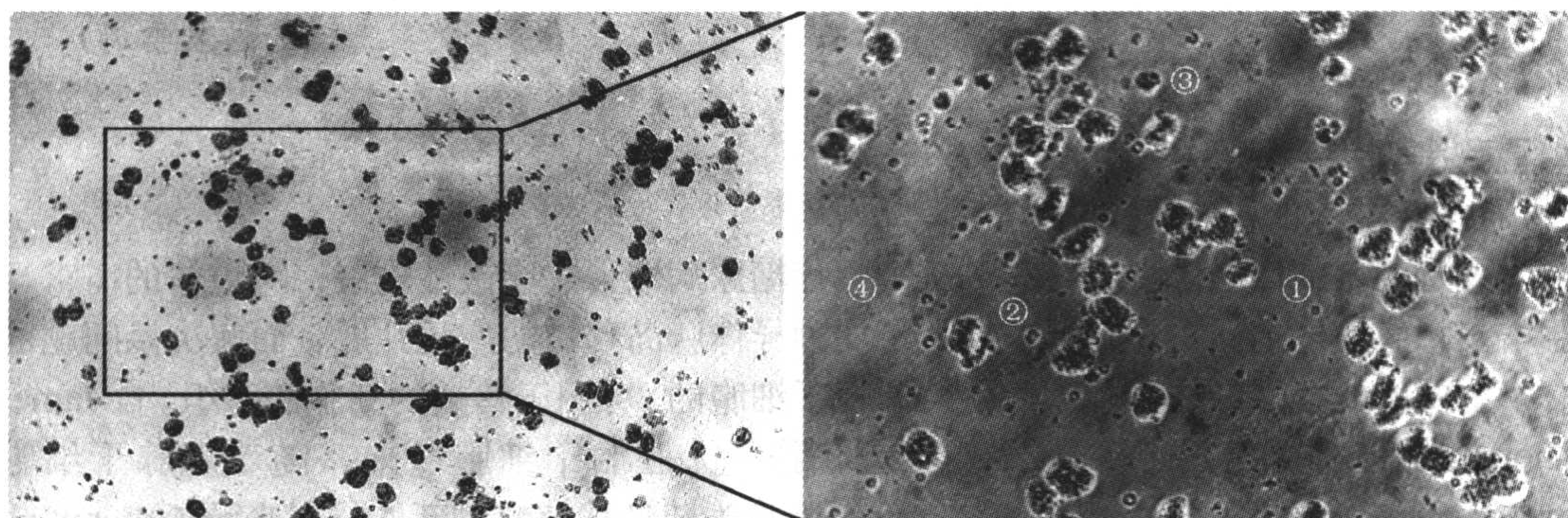


图 4.27 BDTC 与 AA 损伤的肝脏细胞共培养(分别为 100×、200×)

其中①、②、③、④分别显示的是已分化成熟的多核细胞、双核细胞、分化过程中尚未成熟细胞和未分化细胞

2) 透射电镜形态观察肝脏细胞超微结构

BDTC 诱导至 7 天时，取出共培养体系中的上室，以 3%戊二醛于培养皿原位 4℃前固定 2h，以 1%锇酸 4℃后固定 1h 后，蔗糖缓冲液反复漂洗，梯度乙醇脱水、入丙酮后，以树脂渗透、包埋、聚合，用 ULTRACUTE/S 型切片机超薄切片，醋酸铀-枸橼酸铅双重染色，Philips CM120 透射电子显微镜观察细胞超微结构。

3) 免疫细胞化学检测

将诱导 7 天的细胞用胰酶消化后 50*g* 离心、诱导前的细胞 500*g* 离心后分别制成细胞悬液，细胞甩片，多聚甲醛固定和羊血清封闭后，分别与抗 Thy-1、白蛋白(albumin，Alb)和甲胎蛋白(AFP)抗体孵育，以 SP 试剂盒进行免疫细胞化学检测，DAB 试剂盒显色。

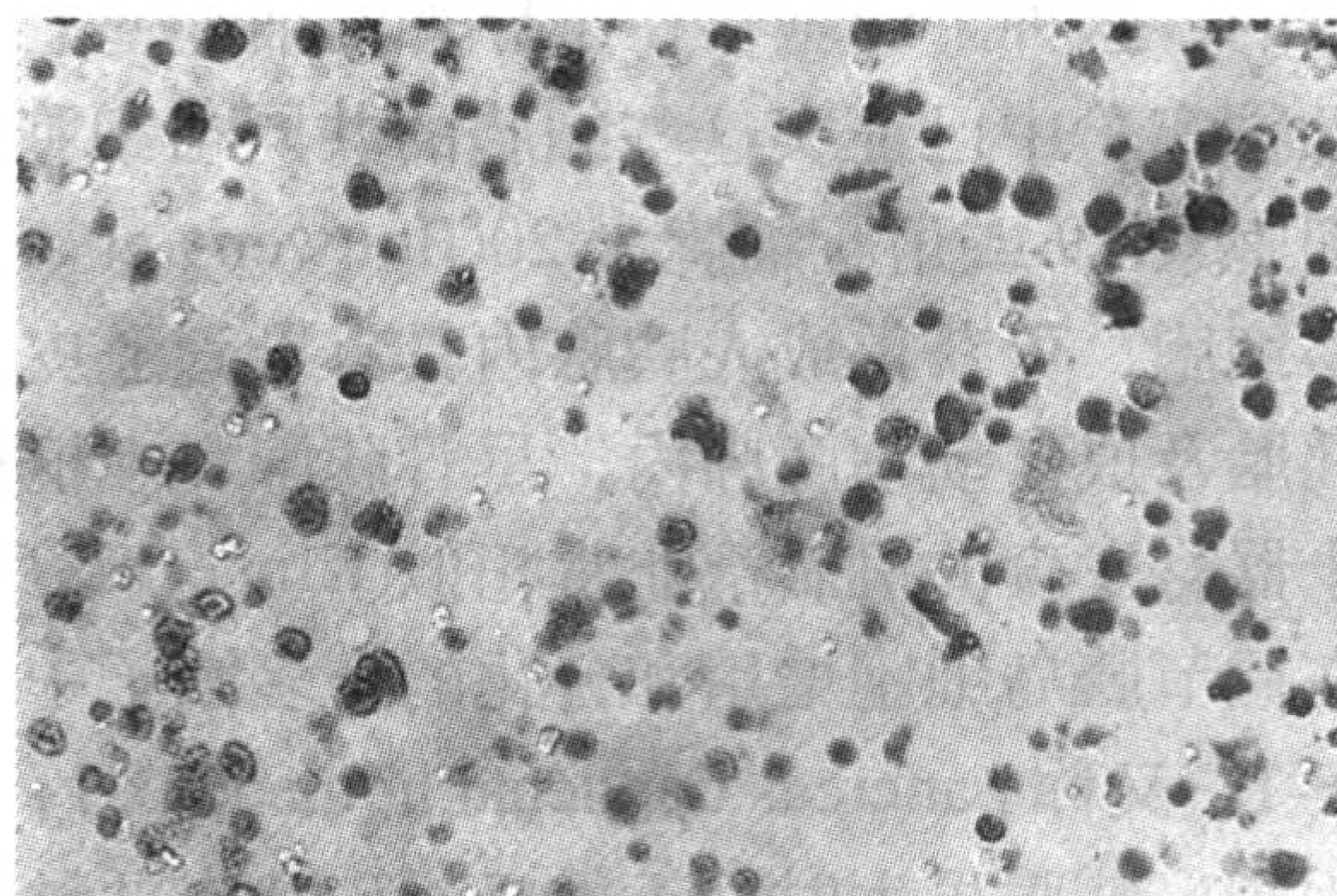


图 4.28 ICG 摄取实验

体积增大的 BDTC 被染成深绿色，而形态无变化的 BDTC 颜色未变

4) 细胞培养上清中尿素和白蛋白的产量

诱导分化 7 天的 BDTC 经 PBS 冲洗换用无血清的 DMEM 培养基，加入 0.15mol/L 的 NH_4Cl，常规培养 8h 后收集细胞培养的上清，在全自动生化分析仪上检测培养上清中尿素和白蛋白的分泌量。

5) ICG(indocyanine green，靛青绿)摄取、排泌实验

将诱导分化 7 天的 BDTC 用 PBS 冲洗后，加入 1mg/ml ICG 于 37℃孵育 15min 后，显微镜下观察细胞颜色的变化。再用 PBS 冲洗 2 遍，换回完全培养液继续常规培养，并观察细胞颜色的变化(图 4.28)。

6) RT-PCR 方法检测

还可以用 RT-PCR 的方法检测 BDTC 诱导前、后肝脏细胞相关基因(*AFP*、*Alb*、*CYP2B1*、*CK18*、*CK19*、*HNF* 和*β-actin. Lane* 等)mRNA 的表达变化等。

(张　锐　王韫芳　裴雪涛)

4.7 胰腺干细胞

随着近年临床上同种异体胰岛移植治疗糖尿病取得的突破性进展，对供体的需求日益增多，而供体的严重短缺严重制约了同种异体胰岛移植的广泛开展，而解决该问题的一条主要的途径则是在体外大量培养源于干细胞的、可用于移植的细胞和组织。自 James Thomson(1998)首次报道在体外成功地培养了人胚胎干细胞以来，随着胰腺干细胞(pancreatic stem cell)研究的深入，胰腺干细胞将为胰岛移植提供新的材料来源(Gmyr et al. 2001)。

胰腺干细胞是一种多能干细胞，具有无限分裂和永久自我更新的能力，可在特定因素的影响或诱导下，分化成特定胰腺组织类型。按其来源可分为胚胎源性胰腺干细胞和成体源性胰腺干细胞。而目前文献主要从可分化成胰腺内分泌细胞的多潜能细胞着手研究胰腺干细胞。胰腺在胚胎发育过程中，上皮细胞增殖继而分化形成胰腺内的 3 种类型的细胞：内分泌细胞，腺泡细胞和导管上皮细胞(Edlund et al. 1998)。早在 1987 年 Cossel 就指出成人胰小管管壁上的细胞不仅可以发育成为以上 3 种细胞，甚至可以发育成肝脏细胞，并推测这些不同细胞的发育，可能是从一个源于前肠的内胚层干细胞的全能细胞池开始的，这种干细胞存在于导管的细胞壁上，具有与胚胎类似的多潜能性。在人和啮齿类动物实验中已证实这些细胞的共同祖细胞(progenitor)具有导管上皮细胞的表型，即角朊细胞素 19 或角朊细胞素 20(Bouwens et al. 1994)。另有证据证明，通过在体外培养外分泌细胞，可获得成人胰腺内具有导管上皮表型且有增殖潜能的细胞。胰腺干细胞存在于胚胎及成年动物胰腺内，尽管胰腺和中枢神经系统具有不同的起源和功能，但控制这两个器官发育的机制都非常相似(Kim et al. 1997)。

在调节胰岛细胞增殖和分化的众多因子中，胰岛素启动因子(insulin promoter factor 1，IPF-1，又称 pancreas duodenal homeobox 1，PDX-1)是一主要局限于分化的β细胞内的转录因子。胰腺再生时，正处于增殖状态的导管上皮细胞也重新表达这一转录因子。因此 IPF-1 被认为是重新获得多能分化潜能的胰腺干细胞的标志(Sharma et al. 1999)。国内外已有数个研究组成功地分离和在体外培养了表达 IPF-1 的人胰腺导管上皮细胞，这些细胞具有分化为胰岛细胞的潜能，因而被认为是胰腺干细胞(Gmyr et al. 2000)。

本实验以体外分离人胰腺导管上皮干细胞为例对分离、培养及诱导分化人胰腺干细胞的方法进行了探讨，希望能为对胰腺干细胞的分化调控机制的深入研究及应用干细胞

移植对糖尿病的治疗奠定一定的基础。

4.7.1 密度梯度离心法分离成人胰腺导管上皮干细胞

4.7.1.1 实验所需仪器及材料

①调温低速离心机；②电子天平；③普通光学显微镜；④成人尸体供者来源的胰腺组织；⑤HBSS；⑥V 型胶原酶；⑦单核细胞分离液(Histopaque)；⑧离心管、吸管、培养板等。

4.7.1.2 成人胰腺导管上皮细胞的分离

(1) 取成人尸体胰腺，于解剖显微镜下去除周围的脂肪和结缔组织，冷 Hank 缓冲液冲洗 2 次除去血迹；

(2) 于胰腺内灌注0.5mg/ml V 型胶原酶,(2ml/g 组织),于37℃ Hank 缓冲液中(HBSS)消化 25~30min，可见少许散落组织，并可见胰腺组织变松散；加冷 Hank 缓冲液终止消化，弃去消化液；以含 0.5% 牛血清白蛋白的 4℃的 HBSS 冲洗和离心(1100r/min，20s) 2 次，此时大部分胰腺仍呈完整团块状；加冷 Hank 缓冲液用吸管反复吹打至团块消失，将其滤过 150 目的尼龙筛网，以除去未被消化的大块组织。

(3) 密度梯度离心法：先将过滤后的细胞悬液与 5ml 最高密度的 Histopaque(1.119g/ml)混匀于 50ml 离心管中，再分别将密度为 1.098g/ml、1.077g/ml Histopaque 和 HBSS 各 5ml 分别缓慢沿管壁加入于其上，4℃、1500r/min 离心 20min 后，分别从三个界面(HBSS/1.077、1.077/1.098、1.098/1.119)和离心管底部收获细胞，胰岛多在第一和第二界面(HBSS/1.077、1.077/1.098)，而我们所要的大量外分泌细胞和导管上皮细胞则主要位于第三界面(1.098/1.119)和离心管底。收集细胞后，HBSS 洗涤 2 次(1500r/min 离心 5min)，悬浮细胞计数，备用。

4.7.2 成人胰腺导管上皮干细胞的培养扩增与定向诱导分化

4.7.2.1 实验所需仪器及材料

①超净工作台；②二氧化碳孵箱；③无糖 DMEM 培养基；④胰岛素抗体；⑤胰高血糖素抗体；⑥尼克酰胺(nicotinamide)；⑦胎牛血清；⑧碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)；⑨表皮细胞生长因子(EGF)；⑩N2 添加剂。

4.7.2.2 成人胰腺导管上皮细胞的培养扩增

(1) 收获的细胞按 1×10^5 个/ml 的密度分别接种 3ml 于 25ml 培养瓶和 12 孔板(每孔 1ml，加鼠尾胶原铺板的玻片)，培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中，37℃、5% CO_2 培养箱中培养，培养液中添加 100U/ml 青霉素，100U/ml 链霉素，500μg/L 两性霉素 B。

(2) 培养 24h 后换液，沉降后弃上清，加含 bFGF 、EGF 各 20ng/ml 和 1% N2 添加

剂的 DMEM 培养液(不含血清)继续培养。

(3) 培养 36h 后弃去悬浮的细胞和胰岛；然后用加含 bFGF、EGF 各 20ng/ml 及 1% N2 添加剂的 DMEM 培养液(不含血清)培养，以后每 48h 换液 1 次；待形成类胰岛样细胞团后在培养基中添加浓度为 17.8mmol/L 的葡萄糖、10mmol/L 的尼克酰胺和 2%胎牛血清，继续培养 5 天，可见类胰岛团明显增多，经吸管吹打脱落，镜下手工挑选、收集类胰岛样细胞团。

4.7.2.3 检测

(1) 光镜观察:第 1、3、5、7、9、15、21、27 天收取培养于玻板上及培养瓶中的细胞于普通光镜及相差显微镜下观察；

(2) 电镜观察:第 5、9、15、21、27 天，部分细胞以 2% 戊二醛固定，环氧树脂包埋，2μm 切片，光镜观察，选适当区域作 80nm 超薄切片，醋酸铀和枸橼酸铅染色，电镜观察；

(3) 分别在培养 24h、36h 和 1 周后取出玻片，检测巢蛋白(nestin)、胰岛素及胰高血糖素表达；

(4) 胰岛素释放实验：取分离后的胰腺消化组织悬液 1ml，用双硫腙染液(双硫腙 10mg，99.5%乙醇 3ml，25 氨水 50μl)进行染色，5min 后显微镜下观察。镜下手工挑选胰岛，每次 40 个，共 3 次，每次分别放入葡萄糖含量为 3.3mmol/L 和 16.7mmol/L 的 2ml Hank 缓冲液(含 5% FBS)中，37℃、5% CO_2 培养箱中培养 1h；离心收集上清，−20℃保存。同样方法收取培养出的类胰岛样细胞团 40 个。胰岛素测定采用放射免疫法。

4.7.2.4 结果

经尼克酰胺和高浓度葡萄糖等诱导分化后，细胞突起开始回缩、变短，增长速度加快，培养约 2~3 周后细胞相互聚集形成上皮样团块，类似胰岛样组织，免疫细胞化学染色显示部分细胞呈胰岛素免疫阳性反应，少数细胞为胰高糖素免疫反应阳性。随时间延长，胰岛素和胰高血糖素免疫染色阳性细胞数目增多，染色增强。放射免疫法测得细胞上清有胰岛素的分泌，葡萄糖含量高的细胞上清中，胰岛素分泌量也高。

(张　锐　裴雪涛)

4.8 皮肤干细胞的扩增及定向诱导分化

皮肤作为人体最外层的防御系统，具有极强的修复和再生能力。尤其是表皮，由多层角质细胞构成，其基底层存在着对皮肤再生、损伤修复起决定作用的干细胞群，称为表皮干细胞(epidermal stem cell)。它可通过对称分裂或非对称分裂的方式产生定向祖细胞即短暂增殖(transient amplifying，TA)细胞(Jones et al. 1993)，继而分化为表皮细胞、毛囊和皮脂腺。皮肤表皮干细胞这种特有的生物学特性，使之不仅对皮肤的动态平衡的维持发挥作用，而且对皮肤的损伤修复以及皮肤遗传性疾病、皮肤肿瘤等疾病的基因治疗具有十分重要的意义。

早期在对表皮细胞进行体外培养时，根据形成克隆的大小及其不同的增殖潜能，分为3种类型，包括来源于表皮干细胞的 Holoclone 和来源于 TA 细胞的 meraclone、paraclone。尽管由此显示了表皮干细胞强大的增殖潜能，但对其分离鉴别仍存在限制。目前对表皮干细胞的体外分离方法主要有两种。一是选择特异的表面标志通过流式分选进行分离，如已发现的β_1整联蛋白、K19、K15 等，由于它们并不能特异地代表表皮干细胞的表达，因而应用受到一定的限制。P63 为 P53 家族成员之一，近年来研究发现(Mills et al. 1999，Yang et al. 1999)，它可将表皮干细胞和 TA 细胞很好地区分开来，因此作为表皮干细胞的筛选标志，其具有一定的特异性。此外，β-Catenin 作为黏附连接的结构部分以及 wingless/Wnt 信号通路的下游效应器，其磷酸化后在表皮干细胞的表达水平远高于 TA 细胞，因此也可作为一种区分标志。二是利用其对基底膜具有快速黏附的特性进行初步筛选，再根据其克隆形成能力进行单克隆培养。下面就以两种方法相结合，介绍人表皮干细胞的分离培养、鉴定及分化(Jiaxi et al. 2004)。

4.8.1 主要设备与试剂

流式细胞仪、DMEM、Ham F-12、FBS、EGF、转铁蛋白、腺嘌呤、胰岛素、霍乱毒素、氢化可的松、鼠β_1整联蛋白-FITC 单抗、鼠 IgG-FITC 抗体、P63 抗体、外皮蛋白抗体、nestin 抗体、磷酸化β-Catenin 抗体、牛血清白蛋白。

4.8.2 方法

4.8.2.1 人胎儿基底角质细胞的分离培养

(1) 取胎儿全层皮肤，用 0.25%的胰蛋白酶和 0.02%的 EDTA 4℃过夜消化。

(2) 接种于丝裂霉素 C 处理过的 NIH3T3 细胞滋养层上，加入下述培养基。

培养基组成：DMEM 和 Ham F-12(3：1)、10% FBS、20ng/ml EGF、5μg/ml 转铁蛋白、1.8×10^{-4}mol/L 腺嘌呤、5μg/ml 胰岛素、10^{-10}mol/L 霍乱毒素、0.4μg/ml 氢化可的松。

(3) 置于 37℃、5% CO_2、饱和湿度的孵箱内培养。

(4) 每 2 天换液 1 次。

(5) 细胞长到 80%融合时，用 0.02% EDTA 去除滋养层细胞后，胰蛋白酶-EDTA 消化传代。

4.8.2.2 流式细胞仪分选标志细胞

(1) 取传 1 代的角质细胞，用 1% BSA 清洗。

(2) 加入 1% BSA 及 FITC 标记的β_1整联蛋白抗体，37℃孵育 1h。

(3) 1% BSA 清洗 3 次。

(4) 用 70μm 的细胞筛网过滤。

(5) 加入 PI(1μg/ml)染色液，4℃避光保存 30min。

(6) 上流式细胞仪进行分选。

4.8.2.3 免疫荧光检测

(1) 细胞用4% 多聚甲醛室温固定 1h。
(2) PBS 洗 3 次。
(3) 用 Triton X-100 处理 10min。
(4) PBS 洗 2 次。
(5) 加入一抗室温过夜孵育。
(6) PBS 洗 3 次后，加入 FITC 标记的二抗，37℃孵育 45min。
(7) PBS 洗涤后，加入 PI，室温孵育 2min。
(8) PBS 清洗，共聚焦显微镜观察。

4.8.2.4 电镜观察

经流式分选出的细胞用戊二醛固定，行常规脱水、浸透及包埋后，透射电镜下观察。

4.8.2.5 分选出的表皮干细胞的培养

(1) 分选出的表皮干细胞以 10^5 个/孔的细胞密度接种于铺有 IV 型胶原(100μg/ml)的 24 孔板中。
(2) 加入上述培养基，置于 37℃、5% CO_2、饱和湿度的孵箱内培养。
(3) 每 2 天换液 1 次。
(4) 镜下观察细胞形态。

4.8.2.6 细胞克隆形成能力的测定

(1) 将分选的细胞接种于 6 孔板上，密度为 1000 个细胞/孔(6 孔板用前 24h 铺上用丝裂霉素 C 处理过的滋养层细胞)。
(2) 加入上述培养基，置于 37℃、5% CO_2、饱和湿度的孵箱内培养。
(3) 每 2 天换液 1 次。
(4) 培养 2 周后，细胞用福尔马林固定。
(5) PBS 清洗，1% 罗丹明染色。
(6) 镜下计数克隆数，每个克隆至少包括 32 个细胞。克隆形成率(%)(CFE)=克隆数/接种细胞总数×100。

4.8.2.7 悬浮诱导终末分化

(1) 分选细胞置于上述培养基中，包括 1.6%甲基纤维素。
(2) 37℃培养 24h 后，收集细胞进行免疫组化分析。
(3) 细胞用甲醇和丙酮(1：1)的混合液室温固定 10min。
(4) PBS 清洗 3 次。
(5) 加入一抗 4℃过夜孵育。
(6) 下述步骤同 2.3 免疫荧光检测。

4.8.3 结果

4.8.3.1 胎儿基底角质细胞的培养

在分选胎儿(大于 20 周龄)基底细胞时，其表皮很容易从真皮层分离。对于更小胎龄的胎儿，由于分离不彻底，因此很容易混杂真皮成纤维细胞。而污染的成纤维细胞在培养时可阻止角质细胞的生长。分离的胎儿角质细胞在丝裂霉素 C 处理过的 NIH3T3 细胞滋养层上生长良好，并可形成 3 种类型的克隆，即 holoclone、meraclone 和 paraclone。大部分克隆为 holoclone，具有高度的增殖潜能。同时在克隆中央有一些分层的细胞。培养 2 周后，来源于不同胎儿的角质细胞在形态和增殖潜能上无明显差别。

4.8.3.2 流式分离表皮干细胞

根据β_1整联蛋白表达的高低，经流式分选出的细胞中的β_1整联蛋白表达量最高的一群细胞定义为表皮干细胞，而另一群β_1整联蛋白表达量较低的细胞定义为 TA 细胞。

4.8.3.3 表皮干细胞的分子标志

为了对分选出的各类细胞进行鉴别，采用免疫荧光的方法对人表皮干细胞的表面标志进行检测。结果发现分选出的细胞中都高表达β_1整联蛋白和磷酸化的β-catenin。而 *P63* 在定义的表皮干细胞的细胞核中有表达，表明这类细胞即为表皮干细胞。

4.8.3.4 表皮干细胞的形态

电镜下，分选出的表皮干细胞核大，胞质少，胞质细胞器较少，表明这群细胞具有原始细胞的特征。而 TA 细胞核小，胞质比例较大，胞质细胞器也相应较多。

4.8.3.5 表皮干细胞的增殖

当表皮干细胞接种于铺有 IV 型胶原的孔板后，95%的细胞在 20min 内黏附于孔板底部。开始表皮干细胞生长缓慢，6 天后，其增殖加速，10 天后细胞融合。而 TA 细胞则在 7 天内达到融合。表明干细胞进入增殖周期较 TA 细胞慢。

4.8.3.6 表皮干细胞的集落形成能力

将分选的细胞在滋养层上培养 14 天后，通过罗丹明染色，记数形成克隆数。经统计学分析，表皮干细胞的克隆形成率为(35.6±5.4)%，而 TA 细胞的克隆形成率为(4.5±1.1)%。表明分选出的表皮干细胞比 TA 细胞具有更强的增殖能力。

4.8.3.7 表皮干细胞的终末分化

分选细胞置于含有 1.6%甲基纤维素的培养基后培养。24h 后，发现所有细胞都表达外皮蛋白，标志着分选细胞向角质细胞的终末分化。

4.8.4 注意事项

表皮干细胞的鉴别主要是根据其表面标志和克隆形成率这两个参数进行的。该方法所获得的胎儿表皮干细胞的克隆形成率较报道的略低，分析可能是因为分选效率或胎儿和成人β_1整联蛋白的表达存在差别所致。总之，由于目前并未寻找到皮肤干细胞表达的特异性标志，因此对其分离、纯化的技术手段及体外诱导分化的各种培养体系尚不成熟，有待于进一步研究。

(高艳红　裴雪涛)

主要参考文献

艾国平，粟永萍，闫国和等. 2001. 骨髓间充质干细胞的分离与培养. 第三军医大学学报，23：553~555

白慈贤，王冬梅，李梁等. 2003. Lin-CD_{34}-造血干细胞分离方法的建立及其体外培养特性的初步研究. 中华血液学杂志，24：105~106

徐国权. 2001. 大鼠胎肝细胞的分离、纯化、体外诱导分化及同种脾内移植的实验研究. 中山医科大学博士学位论文

Armand O,Boutineau AM, Mauger A et al. 1983. Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. Arch Anat Microsc Morphol Exp,72: 163~181

Avital I, Inderbitzin D, Aoki T et al. 2001. Isolation, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. Biochem Biophys Res Commun, 288: 156~164

Bouwens L, Lu WG, Krijger D et al. 1997. Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas. Diabetologia, 40:398~404

Brazelton TR, Rossi FM, KEshEt GI et al. 2000. From marrow to brain:expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science,290: 1775~1779

Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M et al. 2004. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. Blood, 103: 4310~4316

Carotta S, Pilat S, Mairhofer A et al. 2004. Directed differentiation and mass cultivation of pure erythroid progenitors from mouse embryonic stem cells. Blood, 104: 1873~1880

Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE et al. 2001. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's isease. Exp Neurol, 171: 98~108

Cossel L. 1987. Intermediate cells in the Pencreas and cell transformation. Zentralal Allg Pathol, 133: 503~516

Dexter TM, Aellen TD, Lajtha LG et al. 1977. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. J Cell Physiol, 91: 335~344

Ferrari G, Cuwllu-tle A G, Golella M. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 279: 1529~1530

Gammaitoni L, Bruno S, Sanavio F et al. 2003. *Ex vivo* expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. Experimental Hematology, 31: 261~270

Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H et al. 2005. *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. Nat Biotech, 23: 69~74

Gmyr V, Kdrr-Conte J, Vandewalle B et al. 2001. Human pancreatic ductal cells: large-scale isolation and expansion. Cell Transplantation, 10: 109~121

Gmyr V, Kerr-Conte J, Belaich S et al. 2000. Adult human cytokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 *in vitro*: further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans. Diabetes, 49: 1671~1680

Gonzalez-Reyes A. 2003. Stem cells, niches and cadherins: a view from *Drosophila*. J Cell Sci, 116: 949~954

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD et al. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation.

Nature,401:390~394

Hou L, Cao H, Wang D et al. 2003. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. Int J Hematol, 78(3): 256~261

Issaad C, Croisille L, Katz A et al. 1993. A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human $CD34^{+}/CD38^{-}$ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. Blood, 81: 2916~2924

Jang YY, Collector MI, Baylin SB et al. 2004. Hematopoietic stem cells convert into liver cells with in days without fusion. Nat Cell Biol, 6: 532~539

Jauregui HO. 1999. Cellular component of bioartificial liver support systems. Artif organs,23: 889~893

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T et al. 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. Experimental Hematology, 30: 896~904

Jiaxi Z, Shuyi C, Weimin L et al. 2004. Enrichment and identification of human fetal epidermal stem cells. Human Reproduction,19: 968~974

Jones PH, Watt FM. 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of difference in integrin function and expression. Cell,73: 713~724

Kim SK, Hebrok M, Melton DA. 1997. Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. Development, 124: 4243~4252

Kjastura J, Leri A, Finato N et al. 1998. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 8801~8805

Malhi H, Irani AN, Gagandeep S et al. 2002. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. J Cell Sci, 115: 2679~2688

Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D. 2001. Stem Cell Biology. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 245~255

Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N et al. 2004. Adult cardiac Sca-1 positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. J Biol Chem, 279: 11384~11391

Mills A A, Zheng B, Wang X T et al. 1999. P63 is a P53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature, 398: 708~713

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH et al. 1999. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization and molecular cloning. Blood, 90: 5013~5021

Orlic D, Hill JM, Arai AE. 2002. Stem cells for myocardialregeneration. Circ Res, 91: 1092~1102

Park S, Lee KS, Lee YJ et al. 2004. Generation of dopaminergic neurons *in vitro* from human embryonic stem cells treated with nuurotrophic factors. Neuroscience Letters, 359: 99~103

Patricia AZ, Miň Z, Hiroshi M et al. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Engineering. 7: 211~228

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284: 143~147

Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP et al. 2002. Chimerism of the transplanted heart. N Engl J Med, 346: 5~15

Quirici N, Soligo D, Caneva L et al. 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow $CD133^{+}$ cells. British Journal of Haematology, Br J Haematol, 115: 186~194

QuPetersen Z, Deasy B, Jankowski RJ et al. 2002. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. J Cell Biol 157: 851~864

RomeroRamos M, Vourc'h P, Young HE et al. 2002. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. J Neurosci Res, 69: 894~907

Seale P, Rudnicki M A. 2000. A new look at the origin, function and "stemcell" status of muscle satellite cells. Developmental Biology, 218: 115~124

Serra PA, Esposito G, Enrico P et al. 2000. Manganese increase L-DOPA auto-oxidation in the striatum of the freely moving rat:potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease. Br J Pharmacol, 130: 937~945

Sharma A, Zangen DH, Reitz P et al. 1999. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during ncreatic regeneration. Diabetes, 48: 507~513

Studer L, Csete M, Lee SH et al. 2000. Enhanced proliferation survival and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. J Neurosci, 20: 7377~7383

Sui X, Tsuji K, Ebihara Y et al. 1999. Soluble interleukin-6(IL-6) receptor with IL-6 stimulates megakaryopoiesis from human

CD34+ cells through glycoprotein(gp)130 signaling. Blood, 93: 2525~2532

Suzuki A, ZhengYW, Kaneko S et al. 2002. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. J Cell Biol, 156: 173~184

Thomson JA, Itskovitz Eldor J, Shappiro SS et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282: 1145~1147

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ et al. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res, 61: 364~370

Yan J, Studer L, McKay RDG. 2001. Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. J Neurochem, 76: 307~311

Yang A, Schweitzer R, Sun D et al. 1999. P63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature, 398: 714~718

Yin A, Miraglia S, Zanjani E et al. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood, 90: 5002~5012

Young HE, Duplaa C, Young TM et al. 2001. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: I pluripotent mesenchymal stem cells. Anat Rec, 263: 350~360

Young HE, Steele TA, Bray RA et al. 1999. Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56 and MHC class I. Proc Soc Exp Biol Med, 221: 63~71

Yukari M, Morayma R, Yoshihiko N et al. 2003. *In vivo* and *in vitro* differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. Experimental hematology, 31: 1323~1330

Zammit PS, Beauchamp J. 2001. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? Differentiation, 68: 193~204

Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA et al. 1999. KDR receptor: A key marker defining hematopoietic stem cells. Science, 285: 1553~1558

第5章　干细胞体内增殖分化

在当前研究中，为排除体内复杂的调控网络对干细胞发育分化的影响，使研究简化，多采取的是体外诱导分化来研究干细胞的分化潜能。然而，体外诱导条件并不能完全反映细胞所处的体内真实环境。因此，欲对干细胞的发育分化潜能进行深入研究，体内实验是必不可少的。和所有的体内移植一样，异体干细胞体内移植的最大问题在于机体的免疫排斥。因此，研究异体干细胞体内移植模型就要求移植动物(受体)对于移植干细胞具有完整的免疫缺陷或免疫耐受，即在提供机体复杂网络调控、营养供应的同时，要求移植环境不发生针对移植干细胞的免疫反应。目前的研究策略主要有两方面：面向动物成体的移植主要是寻找免疫缺陷的动物或是选取具有免疫豁免能力的部位进行移植，如造血干细胞在NOD/SCID小鼠(non obese diabetic/severe combined immunodeficient mice，重症联合免疫缺陷小鼠)的植入、干细胞在睾丸内的植入等；另一方面就是利用动物胚胎免疫功能发育尚不完善的特点进行移植，如宫内注射人源造血干细胞以构建人羊嵌合体，以及当前进行较多的利用胚胎干细胞囊胚植入构建嵌合体等。与此同时，以治疗为目的干细胞体内移植工作也已经全面展开。在体外对干细胞进行培养增殖、诱导分化、基因修饰后再移植回体内，针对机体特定细胞组织的缺损进行修复治疗已是较为成熟的研究思路。

本章将主要从上述的三个方面对目前较成熟的实验方法、动物模型进行介绍。5.1主要介绍向成体动物体内移植干细胞的操作方法、检测手段、评估指标等；5.2主要提供向动物胚胎、囊胚中移植干细胞，构建嵌合体的实验流程、结果分析、注意事项等；5.3主要针对当前干细胞治疗中评估困难的特点，重点介绍干细胞活体内示踪技术。

5.1　干细胞向成体动物体内移植——NOD/SCID小鼠造血干/祖细胞移植

5.1.1　基本原理

SCID小鼠为一种先天性T、B细胞双重免疫缺陷动物。SCID小鼠由美国学者Bosma 1983年首先发现于C.B/17近交系小鼠，是由位于16号染色体的*scid*隐性基因突变所致。纯合*scid*基因突变导致了淋巴细胞抗原受体基因*V*、*D*、*J*编码的重组酶活性异常，使抗原受体基因*V*、*D*、*J*不能正常重排，T、B淋巴细胞不能分化为功能性淋巴细胞，使得细胞免疫、体液免疫均缺陷，但该小鼠非淋巴性造血细胞分化不受影响，巨噬细胞、粒细胞、巨核细胞、红细胞、NK细胞均呈正常状态，骨髓造血微环境和胸腺基质也正常。另外，*scid*基因突变也影响了该种小鼠的DNA修复系统，使其组织器官对电离辐射高度敏感而不能修复DNA的断裂。

NOD/SCID 小鼠是用 SCID 小鼠与 NOD/LtSz 系非肥胖性糖尿病(non obese diabetic)小鼠回交产生的后代。它既存在 *scid* 基因突变引起的 T、B 细胞缺乏，又存在 *NOD* 突变引起的 NK 细胞活性下降，补体和巨噬细胞功能缺陷，NOD/SCID 小鼠比 SCID 小鼠残留的免疫功能更少。而且 NOD/SCID 小鼠因为 *SCID* 突变缺乏 T 细胞和 B 细胞免疫而不会发生自身免疫性糖尿病。因此，利用 NOD/SCID 小鼠进行干细胞移植具有完整的免疫缺陷，不易发生免疫排斥，能高效的移植异体干细胞，又有足够长的寿命完成移植后的观测。NOD/SCID 小鼠已成为当前干细胞移植、干细胞体内增殖分化研究中最常用的动物模型。其经典的实验莫过于向亚致死剂量照射的 NOD/SCID 小鼠体内移植入外周血造血干/祖细胞，研究其造血重建功能。

5.1.2 主要设备与试剂

5.1.2.1 仪器设备

二氧化碳孵箱、荧光倒置显微镜、恒温离心机、−70℃超低温冰箱、高速低温离心机、PCR 仪、流式细胞仪、数码照相机、酶标仪、超净工作台、电泳仪、恒温水槽、台式高速离心机、普通光学显微镜、倒置显微镜、电子分析天平、恒温振荡器、−20℃卧式低温冰柜、冰冻切片机、组织切片机、钴源 ^{60}Co、微型琼脂糖电泳槽。

5.1.2.2 主要试剂

PCR 试剂盒和 RT-PCR 试剂盒；100bp DNA marker 嘌呤霉素(puromycin)；聚凝胺(polybrene)；

CD45-PerCP/CD3-FITC/CD4-PE 三色荧光标记抗体、CD3-FITC 荧光标记抗体、CD4-PE 荧光标记抗体；新霉素、多黏菌素 B、乳酸环丙沙星；4%多聚甲醛、肝素；磷酸盐缓冲液 PBS；分析纯氯仿、无水乙醇、异丙醇、乙醚；电泳用琼脂糖、碘化丙锭(PI)、溴化乙锭(EB)。

5.1.2.3 实验动物

NOD/SCID 小鼠，6~8 周龄，体重 18~20g，雌性；三级动物饲养环境；笼具、垫料、饲料及饮水均高压灭菌，每周更换 2 次。饮水酸化。

5.1.3 操作步骤

5.1.3.1 动物预处理

(1) 照射前准备：照射前 2 周，饮水加抗生素：新霉素 1g/L，多黏菌素 B 10^6U/L，乳酸环丙沙星 0.1g/L，至照射后 4 周；

(2) 动物照射：细胞移植前 1 天，将小鼠放入经无菌处理的照射盒中，给予总剂量为 2.5Gy 的 ^{60}Co-γ 全身照射，剂量率为 20cGy/min；照射结束后无菌条件下将小鼠转入动物房。

5.1.3.2 造血干细胞移植

(1) 小鼠照射后 12~24h，按照 2×10^7 个/只、5×10^7 个/只的浓度经尾静脉向小鼠体内接种经分离纯化的供体造血干细胞；

(2) 观察小鼠存活情况，每周测小鼠体重，取尾静脉血，测定小鼠外周血中人 $CD45^+$、$CD3^+$、$CD4^+$细胞的比例；

(3) 移植后 6 周，断颈处死小鼠前，取肝脏、脾、骨髓制备细胞悬液，4%多聚甲醛固定，流式细胞仪检测；

4%多聚甲醛固定液：称取多聚甲醛 40g，加入 1000ml 的容量瓶中，先加入 0.1mol/L PBS 约 900ml，放入磁力搅拌棒，加 NaOH 助溶，调整容量至 1000ml，调整 pH 至 7.4。

5.1.3.3 外周血流式细胞仪检测方法

(1) 无菌环境下，每只 Ep 管中分别加入 20μl 肝素(125U/μl)用于抗凝，经尾静脉取血 50μl，颠倒混匀；

(2) 每只 Ep 管中分别加入 10μl 抗 CD45/CD3/CD4 抗体；室温，避光孵育 20min；

(3) 加入红细胞裂解液，室温避光孵育 15min；

(4) 用 PBS 洗涤 2 次，轻柔重悬，使终体积为 300μl；

(5) 上机测定。

5.1.3.4 各器官细胞悬液制备及流式细胞仪检测方法

(1) 移植后存活 6 周的 NOD/SCID 小鼠经颈椎脱臼法处死后，于 75%乙醇中浸泡 3min 后，置超净工作台内，无菌条件下，快速切取部分肝脏、脾，游离股骨。

(2) 肝脏、脾组织在 180~200 目不锈钢网上研磨过滤，经 4 号针头(或一次性无菌 1ml 注射器)过滤，制备单细胞悬液。

(3) 股骨游离后，从两端关节处剪断，经注射器冲洗，同样针头过滤，制备骨髓单细胞悬液。

(4) 在骨髓、外周血、肝脏、脾脏各细胞悬液中加入红细胞裂解液以裂解红细胞，室温避光孵育 15min。

(5) PBS 洗涤，70μm 尼龙网过滤后，轻柔重悬。

(6) 每只管中分别加入 10μl 抗 CD45/CD3/CD4 抗体；室温避光孵育 20min。

(7) PBS 洗涤，重悬，终体积 300μl。

(8) 上机检测。

5.1.3.5 NOD/SCID 小鼠骨髓中人 $CD45^+$细胞的 RT-PCR 检测(两步法)：

1) 细胞 RNA 抽提

(1) 冲洗小鼠股骨中的细胞，每 5×10^6~10×10^6 个细胞加入 1ml Trizol 试剂。

(2) 将细胞并 Trizol 试剂一起移入 1.5ml 离心管中，室温静置 5min；使核蛋白体完全解离。

(3) 加入 0.2 ml 氯仿，颠倒混匀，剧烈振荡 15s，室温静置 5min。

(4) 4℃、10 000~12 000*g* 离心 15min。

(5) 小心将上层水相(约 60%)移至 1.5ml Ep 管中，再加入 500μl 异丙醇，振荡混匀，室温 20min。

(6) 4℃、12 000*g* 离心 10min，凝胶样沉淀物为 RNA。

(7) 吸弃上清，并用 1ml 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀 1 次。

(8) 4℃、7500*g* 离心 10min。

(9) 晾干沉淀，加入 50μl 纯水溶解 RNA 沉淀，−70℃冰箱冻存备用。

2) 逆转录反应

(1) 细胞总 RNA 2μg + Oligo dT 0.5μg，补水至终体积 10μl，90℃加热 5min，冰上骤冷。

(2) 反应体系：

RNA 模板	0.5μl
Oligo dT	50.0pmol/L
10mmol/L dNTP	2.0μl
RNA 酶抑制剂	20U
5×RT 缓冲液	4.0μl
AMVase	10.0U
补 DEPC 水	至 20.0μl

(3) 反应条件：

25℃	10min
42℃	60min
4℃	2min

3) PCR 反应

(1) 反应体系：

逆转录产物	2μl
H_2O	41μl
10×缓冲液	5μl
2.5mmol/L dNTP	0.5μl
引物 1	0.5μl
引物 2	0.5μl
Taq 酶	0.5μl

(2) PCR 反应条件：

94℃、5min；(94℃、30s，58℃、30s，68℃、60s) × 30 个循环；72℃，10min。

(3) PCR 反应产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳，拍照记录。

5.1.3.6 NOD/SCID 小鼠病理切片制备

(1) 小鼠断颈处死，迅速取肝脏、脾脏、肺等器官固定于 10%多聚甲醛。

(2) 石蜡包埋。

(3) 切片。

(4) HE 染色。

5.1.4 结果判断

利用 NOD/SCID 小鼠联合免疫缺陷的特点，在经亚致死剂量照射摧毁体内造血能力后，移植异体造血干细胞，可在外周血中检测到供体来源的血细胞；在小鼠各脏器内可见局灶性组织增生，多系造血细胞增殖，主要由红系、粒系、巨核细胞系组成。其检测可利用外源细胞的标记，如人白细胞 CD45，或雄性个体 Y 染色体上的 *sty* 基因等标记。

通过本实验可初步证明植入的造血干/祖细胞在 NOD/SCID 小鼠体内的造血重建能力；进一步的实验可选择优化植入步骤，增加移植效率作为切入点，为临床应用提供理论支持。

5.1.5 注意事项

(1) NOD/SCID 小鼠为联合免疫缺陷，抵抗力极弱，在饲养过程中要注意无菌操作，避免感染而导致的动物死亡；另外，受抗原刺激后的小鼠可能会增加其 NK 细胞的活性，降低移植效率。

(2) 照射剂量的把握是实验的关键，过量照射容易导致动物早期死亡率的增加，影响结果的观测。

(3) 植入细胞的数量也是需要重视的地方，植入细胞数目较少会给后期的检测带来困难；而较多的细胞植入又可能会带来移植物抗宿主反应(graft-versus-host disease，GVHD)。

(4) NOD/SCID 小鼠因体内免疫缺陷，体内自发成瘤较高，成活时间大多在 1 年左右，对于长期的体内植入实验有一定的限制。

5.2 干细胞向动物胚胎移植——胚胎干细胞囊胚植入构建嵌合体

5.2.1 基本原理

在研究干细胞的全能性方面，最能说明问题的实验就是嵌合体的构建，利用在囊胚期动物的免疫能力尚未发育的特点，将干细胞移植到动物的囊胚中，形成聚合胚，然后发育为成熟个体，干细胞来源的细胞参与动物个体各胚层的分化，组织器官的构成，从而可以说明干细胞具有分化为全身各种细胞的能力。目前具有这种能力的主要是胚胎干细胞(ES 细胞)。在 20 世纪 70 年代以来，人们已先后获得了大鼠、兔、羊、牛、猪等的嵌合体。

本节主要介绍利用胚胎干细胞构建人鼠嵌合体的步骤，这将为今后通过构建嵌合体来鉴定 ES 细胞系或利用基因修饰 ES 细胞途径而获得转基因动物奠定基础。

5.2.2 主要设备与试剂

5.2.2.1 实验动物

实验小鼠，二级。6~8 周龄，体重 24~45g，饲养室温 18~25℃，黑夜白昼时间各 12h。

5.2.2.2 主要试剂

DMEM(高糖)、FBS、NBCS、0.05%胰蛋白酶/EDTA、矿物油(mineral oil)、丝裂霉素 C(mitomycin C)、DMSO、明胶(gelatin)、PBS、HEPES、0.25% 胰蛋白酶/EDTA、mLIF、β-巯基乙醇、Hank 缓冲液。

5.2.2.3 仪器设备

解剖显微镜、倒置显微镜、体视显微镜、倒置相差显微镜、纤维光学入射光源、显微操作仪、显微注射操作系统、显微镜温控仪、拉针器、微锻炉、磨针器、电热鼓风干燥箱、冰藏冷冻箱、蒸汽消毒器、电热恒温板、电子天平、自动搅拌器、二氧化碳培养箱、超净工作台、离心机、液氮罐、−70℃冰箱、超纯水装置。

5.2.2.4 常用溶液配制

1) 丝裂霉素 C 储存液

2) ES 细胞培养液(ESM)

DMEM	4.5g/L 葡萄糖
β-巯基乙醇	10^{-4} mol/L
谷氨酰胺	2mmol/L
非必需氨基酸	1%
丙酮酸钠	1mmol/L
FBS	15%
mLIF	500 IU/ml

3) 饲养层细胞培养液(MEF)

高糖 DMEM	(4.5g/L 葡萄糖)
NBCS	10%

4) 激素的配制

(1) PMSG 的配制：取一支 1000 IU 的 PMSG，生理盐水溶解，2.0ml 的离心管分装，使终浓度为 10 IU。−20℃密封保存备用。

(2) hCG 的配制：配制方法同 PMSG 的配制，使终浓度为10IU。−20℃密封保存备用。

5) 冻存液的配制

将 1ml 的 DMSO 和 3ml 的 FBS 加入到 6ml 的细胞培养液中配制成 10ml 的冻存液，

现配现用。

5.2.3 操作步骤

5.2.3.1 小鼠胚胎成纤维细胞的分离与培养

1) 小鼠胚胎成纤维细胞的分离

(1) 对妊娠 13.5 天的昆明白小鼠颈椎脱臼处死，75%乙醇浸泡 3min 消毒。

(2) 小鼠放置于 35mm 培养皿中在无菌条件下转入超净工作台，眼科镊交叉提起腹部皮肤，确保未夹住腹腔脏器后，用皮剪于下腹部横切一口，然后沿小鼠腹腔向两侧剪开，呈 U 形切口，向上纵向翻剥皮肤，充分暴露腹膜。

(3) 更换手术器械，打开腹腔，游离并取出整个子宫，放入盛 PBS 的 35mm 培养皿中。剪开子宫角及胎膜，将鼠胚移到另一盛满 PBS 的培养皿中。

(4) 剪去小鼠胚胎头部、尾部及红色肝脏等脏器，用 PBS 清洗 3~4 次以清除红细胞、细胞碎片等，用眼科剪将组织剪碎成约 $1mm^3$ 的小组织块。

(5) 用吸管将组织移入 50ml 离心管中，加 5ml 0.05% T/E 细胞消化液，放入 37℃、5% CO_2、饱和湿度的 CO_2 培养箱中 30min，每隔 10min 取出轻柔吹打 1 次。

(6) 加 5ml 细胞培养液以终止消化，用吸管轻柔吹打分散细胞后，用 200 目滤网过滤细胞悬液，收集于 15ml 离心管中，低速离心(1000r/min×5min)。

(7) 弃上清，加 8~10ml 细胞培养液，取 200μl，镜下计数，调整细胞密度，取 5×10^5~10×10^5 个/ml)，接种于 $75cm^2$ 培养瓶中。

(8) 置 CO_2 培养箱进行培养。每 2 天传代一次，待细胞传代 2~3 次后，即可用于制备饲养层或进行继代培养。

2) 胎鼠成纤维细胞的传代

(1) 吸弃瓶中旧细胞培养液。

(2) 每瓶加入 5ml PBS，轻柔漂洗后吸弃。

(3) 用吸管取 1ml 0.05% T/E 加入到 $75cm^2$ 的细胞培养瓶中，在 CO_2 培养箱中放置 1~3min。

(4) 吸弃胰酶消化液。

(5) 用 5ml 的移液管吸取 5ml 的细胞培养液加入到 $75cm^2$ 的培养瓶中，轻轻吹打使贴壁的细胞全部脱落，然后在相差显微镜下观察细胞离散程度，调整吹打情况。

(6) 取离散的单细胞悬液 200μl/滴，加于细胞计数板上进行计数，调整细胞密度为 5×10^5~10×10^5 个/ml，接种于 $75cm^2$ 的培养瓶中之后转移到 CO_2 培养箱(5%CO_2、37℃、饱和湿度)中培养。

3) 小鼠胚胎成纤维细胞的冻存

(1) 细胞消化操作同传代。

(2) 离心收集细胞，吸弃上清。

(3) 用细胞冻存液重悬细胞沉淀，移入冻存管中，然后放入冻存盒移入−70℃冰箱，以 1℃/min 的速度梯度降温，12h 后转移至液氮中长期保存。

细胞冻存液的配制：将 1ml 的 DMSO 和 3ml 的 FBS 加入到 6ml 的细胞培养液中配制成 10ml 的冻存液，现配现用。

4) 小鼠胚胎成纤维细胞的复苏

(1) 依照实验安排及所需的细胞数量计划所要复苏细胞的多少。

(2) 液氮罐中取出冻存细胞，迅速投入 37℃水浴。

(3) 在水浴中轻柔晃动直至冻存管内液体全部融化。

(4) 将管内液体全部吸入到预先准备好的 10ml 离心管中，用 PBS 洗涤 2 次，去除对细胞有毒性的冻存液。

(5) 吸取 10ml 的培养液重悬复苏的细胞沉淀，转移到 $25cm^2$ 的培养瓶中。

(6) 标记名称、代数、时间、使用者后，转移到 CO_2 培养箱(37℃、5% CO_2、饱和湿度)中培养待用。

注意：在细胞冻存复苏过程中，一般的原则是慢冻快融。

5) 小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的制备

(1) 选择铺满 $75cm^2$ 细胞培养瓶底的 2~4 代小鼠胚胎成纤维细胞，吸弃旧培养液。

(2) 在其中加入 8ml 丝裂霉素 C 液，然后放在 CO_2 培养箱中培养 2h(37℃、5% CO_2、饱和湿度)。

(3) 用 5ml 的移液管吸取 3ml 0.2%明胶缓慢加入 60mm×15mm 的培养皿中备用。

(4) 将已经用丝裂霉素 C 处理 3h 的细胞用 PBS(5ml/次)清洗 5 次，尽量除去丝裂霉素 C。

(5) 消化同传代。

(6) 在取 200μl 进行细胞记数之后。将已调整细胞密度(5×10^6 个/ml)的单细胞悬液接种于已用明胶处理过 3h 的培养皿中。

(7) 标记，转移到 CO_2 培养箱(37℃、5%CO_2、饱和湿度)中培养，视细胞生长状态，在 1~14 天之内用于 ES 细胞的培养。

5.2.3.2 胚胎干细胞(ES)的传代培养

1) ES 细胞传代培养

(1) 选取细胞克隆生长良好、集落明显、细胞致密、细胞间无明显界限、形似鸟巢、形态未分化的集落进行初次传代。

(2) 将小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的培养液弃去，换上 ES 细胞培养液，然后转移到 CO_2 培养箱(37℃、5%CO_2、饱和湿度)中培养待用。

(3) 将 ES 细胞培养皿(60mm×15mm)中的旧液轻轻摇晃弃去。

(4) 用 PBS 洗涤 3 次。

(5) 加入 0.25% T/E 细胞消化液 1ml，转移到 37℃培养箱中放置 2min。

(6) 将消化下来的 ES 细胞用胚胎干细胞培养液中和，用吸管轻柔吹打使细胞团分散为近单细胞悬液。

(7) 将细胞悬液在调整密度后接种到已经换液培养的饲养层上培养。

(8) 观察细胞形态进行传代培养、换液及冻存保种。

2) ES 细胞的冻存保种及复苏

方法同小鼠胚胎成纤维细胞的冻存及复苏。

3) 注射前 ES 细胞的预处理

注射用 ES 细胞于注射前日以 1∶2 传代，常规消化制成单细胞悬液，接种于预先涂布 0.2%明胶的 60mm×15mm 培养皿上，置 CO_2 培养箱(37℃、5% CO_2、饱和湿度条件)中贴壁处理 1h 以去除饲养层细胞，将在 1h 内没有贴壁的细胞用吸管吸弃，加入新的培养液 1ml 并用移液管轻轻吹打使贴壁的 ES 细胞全部脱离而形成细胞悬液，将其移入 EP 管后置于 4℃备用。

5.2.3.3 小鼠胚胎的收集及培养

1) 操作液

(1) 小鼠冲胚液：M_2 液。

(2) 囊胚培养液：DMEM(4.5g/L 葡萄糖)+10% FBS。

2) 囊胚的获取

适用于 12h 照明-12h 黑暗的循环饲养环境(7:00 和 19:00 改变照明)。

(1) 约在 15:00~17:00 时给小鼠腹膜内注射 5IU 的孕马血清促性腺激素(PMSG)。

(2) 约 46h 以后，腹膜内注射 5IU 的人绒毛膜促性腺激素(hCG)。

(3) 与有繁殖能力的雄性小鼠同笼过夜。

(4) 次日清早 7:00 检查阴道有无白色阴栓。

(5) 取阴栓阳性者，将检栓当天为首日，于第 4 天将孕鼠颈椎脱臼处死，在超净工作台内无菌条件下取出孕子宫，从阴道端插入装有 M_2 液的 1ml 的一次性注射器并注入 M_2 液进行冲洗，即可获得发育至囊胚期的早期胚胎。

3) 囊胚的培养

用 M_2 液将冲出来的胚胎洗 3~8 遍后，用玻璃管拉制的移卵针将其转移到用石蜡油覆盖的囊胚培养液液滴中，胚胎培养用 60mm×15mm 的培养皿，在每 50μl 的培养液滴中放入约 10 个胚胎，然后把培养皿转移到 37℃、饱和湿度、含有 5% CO_2 的 CO_2 培养箱中培养至显微注射。

冲卵液及培养液的配方如表 5.1 所示(Trounson 1976)。

表 5.1 冲卵液及培养液的配方

试剂	PBS(g/1000ml)
NaCl	8.0000
KCl	0.2000
$CaCl_2$	0.1000
$MgCl_2$	0.1000
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.8980
KH_2PO_4	0.2000
丙酮酸钠	0.0360
葡萄糖	1.0000
青霉素钠	0.0315
链霉素	0.0500
FCS	冲卵液 5%
	培养液 10%

注：①溶液配制均用超纯水；②配好的培养液调 pH 至 7.2~7.4；③冲卵液和培养液现用现加 FCS；④冲卵液和培养液使用微孔滤膜(0.22μm)过滤；⑤配好的溶液于 4℃冰箱保存，使用期不超过 2 周；⑥含$-PO_4^{3+}$盐溶液要单独配，然后将溶解好的溶液缓慢注入已配好的无机盐溶液中，这样不致生成沉淀。

5.2.3.4 注射针、扶持针及移胚管的制作

1) 注射针的制作

(1) 拉针：洁净的无芯硬质毛细玻璃管($\phi = 1.05$mm)在水平拉针仪上拉出从肩部到尖部约 2~2.5cm 的两根针。

(2) 断针：将拉好的针垂直固定在显微锻针仪上，预先在铂金丝上做一玻璃珠，将铂金丝移至毛细管内径 10~15μm 的部位，并与针管壁接触，加热铂金丝上玻璃珠至所需温度，即针壁与电热丝黏连时，停止加热，针管自动断裂。观察断口是否整齐，若整齐可留用；若不整齐，可再断一次。

(3) 磨针：开动电源，调节转速约 5000r/min，使磨石上的适量超纯水不被离心掉为宜，然后在 10×显微镜下将断口以 45°接触到显微磨针仪的微磨石表面，磨 5~10min，使断口成一个针型斜面，根据针前端的毛吸作用观察所磨针口径的大小，以内径 10~15μm 为较好。

(4) 清洗：用一段医用硅橡胶管与注射器相连构成的装置，在橡胶管端装上磨好的针，在 8%~10%氢氟酸中清洗针尖端外壁(由注射器向针内打气)数秒，然后将针移到超纯水中清洗 10 次，再在无水乙醇中洗涤数次。

(5) 拔尖：将磨好并清洗的针固定在显微锻针仪上，打开灯丝开关，将电压调至 50~60V，使铂金丝加热至微红，加热玻璃珠到微红为宜，调节操作柄移动针尖使其轻触玻璃珠，瞬间即慢慢撤回针尖并切断电源，这样可以在针尖部做出一个短但锐利的针锋，注射时可使针容易刺穿透明带和滋养层，减少对胚胎的损伤。

(6) 弯针及针的消毒处理：将拔尖的针水平放在显微锻针仪上，打开电源开关，通过显微镜升降操作柄和测目器，观察所要弯曲的部位，加热使针弯曲的角度一般以 20°~30°为宜。在使用时用紫外灯照射 15min，然后置于灭菌针盒中备用。

2) 扶持针的制作

(1) 拉针：如同拉制普通的玻璃吸管一样，双手握住外径为 1.0~1.5mm 的厚壁毛细管的两端，将中部在微小酒精灯火焰上烧烤并两手不停旋转，待毛细管变软时，将毛细管移离火焰，同时迅速向两边拉出 5~10cm。

(2) 断针：把拉细的中间切断，这样可以制作两根扶持针。在显微镜下观察毛细管，找到 100~120μm 粗细的部位，该部位与扶持针肩部的距离一般为 1.5~2cm 为宜，用砂轮在这个部位轻轻划痕，即可得到断口面。在显微锻针仪下观察，若断口整齐，则留用，若断口不齐，可以向拉细的扶持针肩部再断一次。

(3) 钝口：将断口平整的扶持针垂直固定在显微锻针仪上，打开电源开关，把断口调到离玻璃珠很近的地方，勿接触。缓慢使玻璃珠靠近断口，直至断口玻璃开始熔化，断口开始渐渐缩小，当断口直径为 70~80μm 时，停止加热，观察钝口，它应该是上下厚度一致、均匀、开口位于中央，否则不宜留用。

(4) 弯针及针的消毒处理：同注射针的制作。

3) 移胚管的制作

与制作扶持针的过程相似，移胚管一般用普通的 BDH 硬玻璃吸管在酒精灯上烧制而成。即其在酒精灯上烧的同时两手需不停转动，待玻璃吸管变软时将玻璃管移开火焰的同时迅速再向两边拉出 5~10cm，用砂轮切断使内径为 130~180μm，外径为 200μm 左右，即大于 1 个胚胎而小于 2 个胚胎。移胚管开口处需加热处理成平滑钝口，目的是便于操作及尽量减少其对子宫的损伤。在弯针时，当细段靠近小酒精灯的火焰时，要保证弯的角度达到 90°为宜。

4) 注射针、扶持针、移胚管葫芦部的制作

在制作好的注射针、扶持针、移卵管肩部，可增加一细段，增加的细段可使气流量减少，针尖动作幅度降低，从而提高注射等动作的精度。

5.2.3.5 ES 细胞的显微注射

1) 实验小鼠的准备与要求

为使研究顺利进行，需要定期提供相当数量的母鼠作为卵供体和代孕母鼠，以及一批相对稳定的正常公鼠与结扎公鼠。各类鼠的有关指标如表 5.2 所示：

表 5.2 实验小鼠的准备情况

类别	供胚母鼠	公鼠	代孕母鼠	结扎公鼠
鼠龄/周	6~8	>8	6~8	>8
体重/g	20~40	20~45	20~40	20~25
作用	囊胚供体	囊胚供体	胚胎移植受体	代孕鼠交配
更换频率	每次	6~8m	每次	6~8m
饲养/(只/笼)	5~6	1	1	1
备注			生产过为佳	结扎 2 周后使用

(1) 胚胎供体母鼠：一般以 6~8 周龄作为超排卵供体，4~6 周龄母鼠产卵更多但卵细胞膜脆性较大，在处理过程中易破裂。而 6 周以后母鼠产卵逐渐减少。故用超排效果会更好。一般超排较好的母鼠每只每次可以得到 20~30 个囊胚。

(2) 公鼠：公鼠性成熟约在 6~8 周，不同种系公鼠性维持时间不一，一般只使用 8~10 个月。每只公鼠需单独饲养以免相互咬伤。刚进的公鼠需饲养 1~2 周后方可与母鼠交配。每只公鼠可与 1~2 只母鼠合笼交配，次日上午检查阴栓，如 2 次以上都不能使母鼠有阴栓，则需要更换公鼠。为保证有足够的胚胎，公鼠最好每周只交配 1~2 次。

(3) 受体母鼠：母鼠在正常发情期与结扎公鼠交配即产生代孕母鼠，代孕母鼠是作为显微注射后恢复囊胚的受体及其后代的养母。这种母鼠在 6 周至 5 个月较适宜，已产过仔并成功抚育过仔鼠的假孕母鼠最理想。

(4) 结扎公鼠：最好选用 8~10 周龄的公鼠进行结扎，无种系要求。在正式实验以前，每只结扎公鼠至少需要先后使 3 只以上母鼠产生阴栓且所有产生阴栓的母鼠均未怀孕；或者将结扎公鼠与超排母鼠交配，次日检完栓后杀鼠冲胚，如果卵不发育或退化，证明结扎成功。然后结扎公鼠才可以用于与母鼠交配，产生假孕母鼠。

2) 操作液

(1) ES 细胞培养液：ESM；

(2) ES 细胞消化液：0.25% T/E；

(3) ES 细胞清洗液：PBS；

(4) 显微注射操作液：DMEM(高糖)：

15mmol/L	HEPES
300IU/ml	DNase I
20%	FBS

(5) 注射胚胎培养液：DMEM(高糖)+10% FBS；

(6) 0.2%明胶的配制：称取0.2g 明胶充分溶解于100ml PBS 中，15lb(1lb = 0.453 592kg) 高压灭菌30min，4℃保存备用。

3) 显微注射

(1) 显微注射系统注油：用矿物油注满显微注射系统。

(2) 安装好注射针和扶持针：将消毒好的注射针和扶持针固定到显微操作仪上，保证吸管内无气泡，调整吸管位置使之尖端聚焦。

(3) 操作滴的准备：在60mm×15mm 塑料培养皿中部制作相邻两滴50μl 的囊胚注射液操作滴，上面用石蜡油覆盖，置4℃预冷处理30min 后置于显微操作仪的载物台上。

(4) 把细胞移入操作滴中：用移胚管将适量ES 细胞及胚胎分别移到两相邻的注射液滴中。

(5) 吸取合适的注射细胞，准备注射：在显微镜下仔细逐个选取所要用的注射细胞吸入注射吸管中，对健康悬浮的细胞，用注射针一次吸取50~100个形态良好的ES 细胞以便进行批量注射。之后，把吸入的ES 细胞定位到注射针的顶端准备注射。

(6) 固定受体囊胚：吹动液体，调整囊胚方向。用扶持针固定住囊胚ICM 处，或者固定住ICM 与滋养层交界处，让ICM 位于囊胚的底部位置，并使囊胚尽可能降低以接近注射室的底壁从而减弱其活动性，增加其固定效果。

(7) 调整注射吸管，使之与固定吸管处于同一焦平面：试着推进注射吸管使之接近囊胚。如果固定吸管与注射吸管处于同一水平，囊胚就会出现一个凹窝。选择滋养层细胞的间隙处，定位，准备注射。在此注射，既可以减少损伤又能避免生成过多的细胞碎片。

(8) 向囊胚腔内注射：定位后，将注射吸管推进入囊胚腔。带有ES 细胞的注射针进入囊胚腔后，突然施加压力，使细胞释放入囊胚腔。

(9) 释放囊胚：细胞释放后，慢慢抽出注射针，通过扶持针将囊胚移到较远的地方释放。

(10) 注射完毕后将同批的胚胎移出，在胚胎操作液 M_2 液中充分洗涤后移到胚胎培养液滴中，然后转入 CO_2 培养箱(37℃、5% CO_2、饱和湿度)中恢复培养，通常注射后的囊胚在培养1h 后即可恢复为正常的形态。

5.2.3.6 胚胎移植

1) 操作液

胚胎操作液：M_2 液；麻醉剂：846合剂。

2) 胚胎移植

(1) 注射后的囊胚经1~3h 的恢复培养后于注射的当日或次日进行移植。

(2) 将怀孕3.5天的母鼠用846合剂进行麻醉，用量为0.03~0.05ml/只。

(3) 用碘伏、75%的乙醇对小鼠背部消毒。

(4) 用皮剪于背部脊柱两侧0.5cm 处约与最后一根肋骨平行的地方剪开皮肤。

(5) 用镊子沿切口撕开皮肤和肌肉，透过腹膜可见卵巢(橘黄色)和脂肪垫(白色)。

(6) 小心夹住脂肪组织，将子宫轻轻拉出固定好。

(7) 在纤维光学入射光源下，在靠近子宫角处寻找血管分布较少的部位，用1ml 注

射器的注射针头穿孔。

(8) 吸胚时可先吸入矿物油充满前端较细部分再吸胚，这样就使吸胚及转移的过程易控制。吸胚前先吸一个气泡，吸一段 M_2 液，再吸第 2 个气泡，然后吸胚胎，并尽量减少吸 M_2 液，吸胚完毕再吸第 3 个气泡和少量 M_2 液。

(9) 将吸好了胚胎的移胚管插入该孔(可明显看到注射针拔出后的出血点)，移胚管延伸进子宫内约 5mm。将 10 枚以上形态正常的囊胚移入单侧子宫内。

(10) 将子宫等组织复位，缝合肌层和皮肤。接着行另一侧子宫的手术及移胚。

(11) 术后的代孕母鼠用 40W 的灯泡供暖至苏醒后并单独饲养，直至正常产仔。

5.2.4 结果判断

嵌合鼠的判定及嵌合鼠的交配：移胚后受孕的代孕母鼠在妊娠第 20 天左右自然分娩，2 周后可以根据毛色显性判定其是否为嵌合体鼠。一般构建嵌合体所用 ES 细胞与受体胚胎可分别具有不同的毛色表型，如黑色与白色，由于供体 ES 细胞与受体胚胎来源品系有明显的毛色区别，故可以根据移植后代是否具有 ES 细胞来源的毛色显性明确判定嵌合体。以 ES 细胞来源的毛色显性所占的大致百分率来估算嵌合程度。将外观无受体品系毛色掺杂的嵌合体毛色嵌合程度认为是 100%。

5.2.5 注意事项

(1) 在实验时间的安排上，尽可能安排在春夏，即动物运动活跃、繁殖性能和生产较旺盛的季节。

(2) 动物房的人工照明控制也是比较关键的，这一因素会影响动物的发情、妊娠。

(3) 饲养层的质量是决定 ES 细胞有效克隆的重要因素，而饲养层的质量取决于饲养层细胞的传代次数、饲养层细胞的密度、饲养层细胞的纯度及有丝分裂阻断剂的处理时间等几方面。

a. 饲养层细胞的传代次数对饲养层质量的影响。胚胎成纤维细胞在体外一般可以分裂 15~20 次，使用寿命可达 2~3 周，3~4 周后细胞逐渐衰老，胞质内颗粒物质增多，透明度变差，胞质内积聚大量的脂肪滴，脂肪很大时可以将胞质及核挤到偏向一侧，细胞轮廓逐渐收缩导致其贴壁不牢，最终就会从皿底脱落，收缩成一团。故细胞的传代次数对饲养层细胞的制作有很大的影响，因为细胞传代过少而使杂细胞较多，所以细胞的纯度大大下降，但传代的代数过多又容易出现细胞衰老。一般选择传代 3~6 次，生长旺盛的细胞进行实验为易。

b. 饲养层细胞的密度对饲养层质量的影响。饲养层在培养皿中最好铺成单层且细胞之间无间隙，因为饲养层所产生的抑制分化因子(LIF)一部分可以分泌到培养液中，另一部分则通过与 ES 细胞的接触而起作用，无间隙的单层细胞保证了 ES 细胞与饲养层细胞的接触达到最佳效果。如果细胞接种密度过小，空隙过多而影响到饲养层的质量，那么接种的 ES 极易分化；如果接种密度过大则饲养层细胞又容易衰老。一般选择细胞铺层厚、细胞核清楚、细胞梭形结构清晰、

胞质多、扁平的饲养层进行接种。一般需在预实验中确定针对特定培养容器的最佳的细胞数目。

c. 饲养层细胞的纯度对饲养层质量的影响。细胞纯度是决定小鼠胚胎成纤维细胞质量的重要因素，贴壁生长的细胞从形态上主要分为上皮细胞型和成纤维细胞型。前者来源于外胚层及内胚层的细胞，为扁平、多角形细胞；后者来源于中胚层的组织细胞，多呈梭形，故在制作饲养层的过程中往往混杂有一定量的上皮样细胞。在制作饲养层时，将消化时间定在 5~10min，可消除极少的死杂细胞及细胞团(非成纤维细胞的其他组织细胞)，能取得良好效果。

d. 有丝分裂阻断剂的处理时间对饲养质量的影响。饲养层是经过 γ 射线照射或经丝裂霉素 C 处理后用作 ES 细胞附着底物并且能产生多种营养因子的一层细胞层。饲养层细胞经射线照射或丝裂霉素 C 处理，其目的是阻断 MEF 的分裂增殖，以避免 MEF 迅速增殖对所培养的胚胎细胞或 ES 细胞产生竞争性抑制，虽然 MEF 失去分裂能力，但仍然保持生存能力，并有同化培养液的能力，可为胚胎发育提供一些必需因子，而且可以除去体外培养环境中的毒素和代谢抑制因子。但丝裂霉素 C 为致癌剂，具很强的细胞毒性，所以用它处理时，在保证有效阻断有丝分裂的前提下，应尽可能的缩短处理时间；一般在 MEF 饲养层制备过程中，以 10μg/ml 丝裂霉素 C 处理 2~3h 最为适宜，并且在操作中应用无钙、镁的 PBS 清洗 7 次以保证无残存的丝裂霉素 C。

e. ES 细胞数目的影响。ES 细胞每 2~3 天传代一次，实验选用培养第 1 天或第 2 天的细胞，使用具有正常整倍体核型的 ES 细胞，以提高 ES 细胞嵌合于生殖细胞系的能力。一般用 10~15 个细胞进行注射。

f. 同期发情的代孕鼠对嵌合体获得的影响。在胚胎移植中，受体和供体必须同期发情，使供体胚胎与受体子宫内膜发育高度同步化才能取得良好的移植效果。这是胚胎移植能否成功的关键之一。在小鼠中，在体外培养的胚胎进行移植时，一般要求受体晚于供体 1 天见栓，即子宫移植时，选用假孕怀孕 2.5 天的受体鼠。

g. 判定嵌合体方法的影响。在构建嵌合体实验中，通常以嵌合体的毛色嵌合程度来推测内脏(尤其是种系)的嵌合程度。有实验表明，在毛色嵌合程度较高的嵌合体中，种系嵌合的发生及种系嵌合的程度似乎是随机的，而与毛色嵌合程度无明显的相关性，这说明毛色嵌合程度与脏器嵌合程度并不完全平行，因此有必要对毛色嵌合程度较低的嵌合体进行测交分析。

5.3 体内可见光成像技术用于干细胞研究

干细胞在肿瘤治疗、组织工程和细胞治疗等方面拥有巨大的潜力。如果能够在活体动物体内，在各种组织和器官都保持完整的情况下来观察干细胞的行为和生物学特性，则会大大促进基于干细胞的各种疾病治疗方法的研究工作。目前已对多种干细胞进行了大量的研究，动物模型研究方法也很多，但典型的方法还是在移植后的几星期或几个月，通过解剖实验动物来了解干细胞的功能。然而采用这种研究方式，就无法得到移植后一

些关键性的实验数据，例如，对于移植后的前几个小时到几天时间内造血干细胞在脾和骨髓的定位和增殖情况；移植后造血干细胞在动物体内的迁移情况等就无法得知。体内可见光成像技术，主要是生物发光成像(*in vivo* bioluminescence imaging，BLI)技术作为一种新型成像技术，在最近几年已被广泛应用于在多种动物模型中示踪肿瘤细胞、造血干细胞、淋巴细胞、病原菌和病毒。本节将简要介绍体内可见光成像技术的成像原理、成像系统使用方法及其在干细胞研究方面的应用。

5.3.1　体内可见光成像技术的成像原理

体内可见光成像技术是采用萤光素酶(luciferase)基因(*Luc*)对细胞和基因进行标记，利用一套非常灵敏的光学检测仪器，让研究人员能够直接监控活体生物体内的细胞活动和基因行为。传统的动物实验方法需要在不同的时间点处死实验动物以获得数据，从而得到多个时间点的实验结果。相比之下，体内可见光成像则是通过对同一组实验对象在不同时间点进行记录，跟踪同一群观察目标(标记细胞或基因)的移动及变化，所得的数据也更加真实可信。另外，该技术由于不涉及放射性物质，具有操作简单、所得结果直观、灵敏度高等特点，在刚刚发展起来的几年时间内，已广泛应用于生命科学、医学研究及药物开发等方面。

5.3.1.1　细胞标记

1995 年，Contag 首次在小动物体内通过 CCD 相机捕捉到这个被感染动物的生物发光现象，检测到带有 *lux* 操纵子的病原菌发出的可见光。在 1997 年，他又首次观察到表达萤光素酶的转基因小鼠在注入萤光素酶底物后的生物发光现象。自此，细菌及萤火虫萤光素酶被广泛应用于小动物体内可见光成像技术中。

哺乳动物生物发光，是将 *Luc* 基因整合到细胞染色体 DNA 上以表达萤光素酶，当外源(腹腔或静脉注射)给予其底物萤光素(luciferin)时，即可在几分钟内产生发光现象。但只有在 ATP、氧气存在的条件下，这种酶催化萤光素的氧化反应才可以发光，因此只有在活细胞内才会产生发光现象，并且发光强度与标记细胞的数目线性相关。对于细菌，*lux* 操纵子由编码萤光素酶的基因和编码萤光素酶底物合成酶的基因组成，带有这种操纵子的细菌会持续发光，不需要外源性底物(图 5.1)。

基因、细胞和活体动物都可被萤光素酶基因标记。标记细胞的方法基本上是通过分子生物学克隆技术，将萤光素酶的基因插到预期观察的细胞的染色体内，通过单克隆细胞技术的筛选，培养出能稳定表达萤光素酶的细胞株。目前，常用的肿瘤细胞株基本上都已标记好，市场上已有销售。而对于非永生系细胞，如干细胞和淋巴细胞，可采用病毒转染或者利用转基因动物的方式获得标记细胞。将标记好的细胞接种到实验动物体内后，观测前需要注射萤光素酶的底物——萤光素。萤光素是 280Da 的小分子，其脂溶性非常好，能很容易透过血脑屏障。注射一次萤光素能保持小鼠体内萤光素酶标记的细胞发光 30~45min。每次萤光素酶催化反应只产生 1 个光子，这是肉眼无法观察到的，精诺真公司(Xenogen Corp.)生产的 IVIS 成像系统，应用一个高度灵敏的制冷 CCD (charge coupled device)相机及特别设计的成像暗箱和成像软件，可观测并记录到这些光子(图 5.2)。

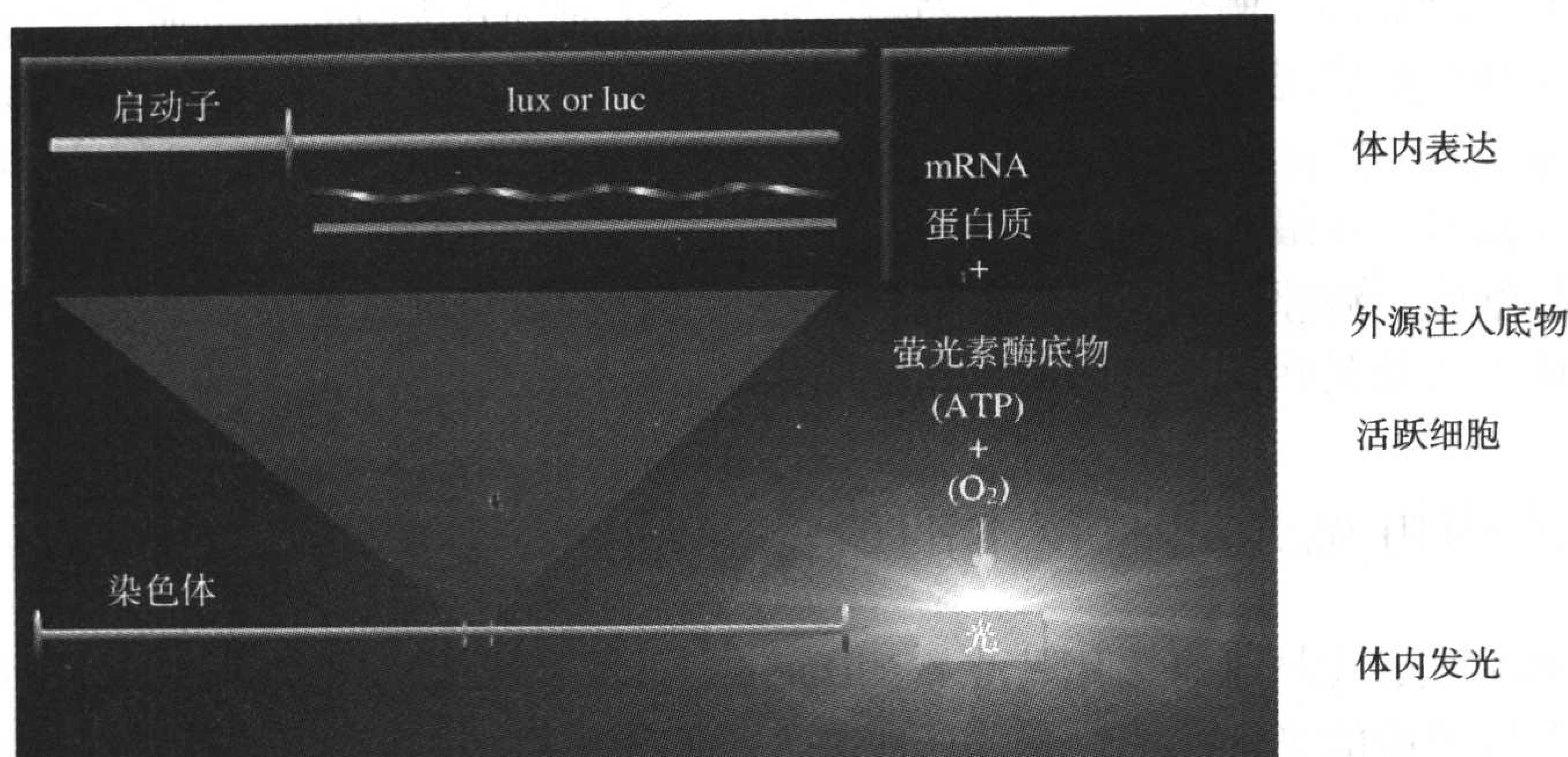


图 5.1　可见光成像原理

将蛋光素酶基因连接于启动子下游，稳定整合到细胞染色体内，使萤光素酶得到持续表达。
在体内，萤光素酶在 ATP、氧气存在的条件下，与外源注入的特异底物发生反应而产生发光现象。
因此仅在活细胞内才会出现萤光，且发光强度与标记细胞数目线性相关

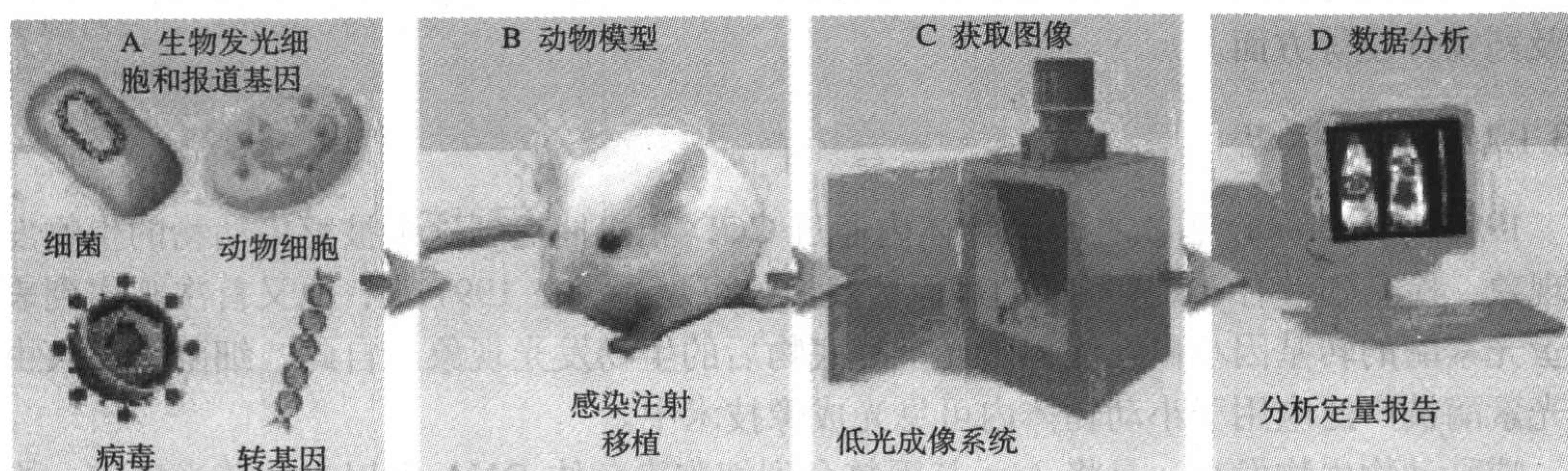


图 5.2　体内可见光成像系统组成

A. 细胞、病原体及病毒均可被萤光素酶标记；B. 小鼠携带标记的细胞及基因；C. 在暗箱中由 CCD 相机记录生物发光；D. 由成像软件定量、分析所得数据

5.3.1.2　不同波长可见光穿透动物组织的能力不同

光在哺乳动物组织内传播时会被散射和吸收，光子遇到细胞膜和细胞质时会发生折射现象，而且不同类型的细胞和组织吸收光子的特性并不一样。血红蛋白(hemoglobin)是造成体内可见光被吸收的主要因素，其吸收可见光中蓝绿光波段的大部分。但是在可见光大于 600nm 的红光波段，血红蛋白的吸收作用却很小。因此，在偏红光区域，大量的光可以穿过组织和皮肤而被检测到(图 5.3)。利用精诺真公司的 IVIS 系统最少可以看到皮下的 500 个细胞，当然，由于发光源在老鼠体内深度的不同，在不同情况下可看到的最少细胞数目是不同的。而在相同的深度情况下，检测到的发光强度和细胞的数量具有非常好的线性关系。体内可见光成像技术的基本原理在于光可以穿透实验动物的组织并且可由仪器量化检测到光的强度，同时可反映出细胞的数量。

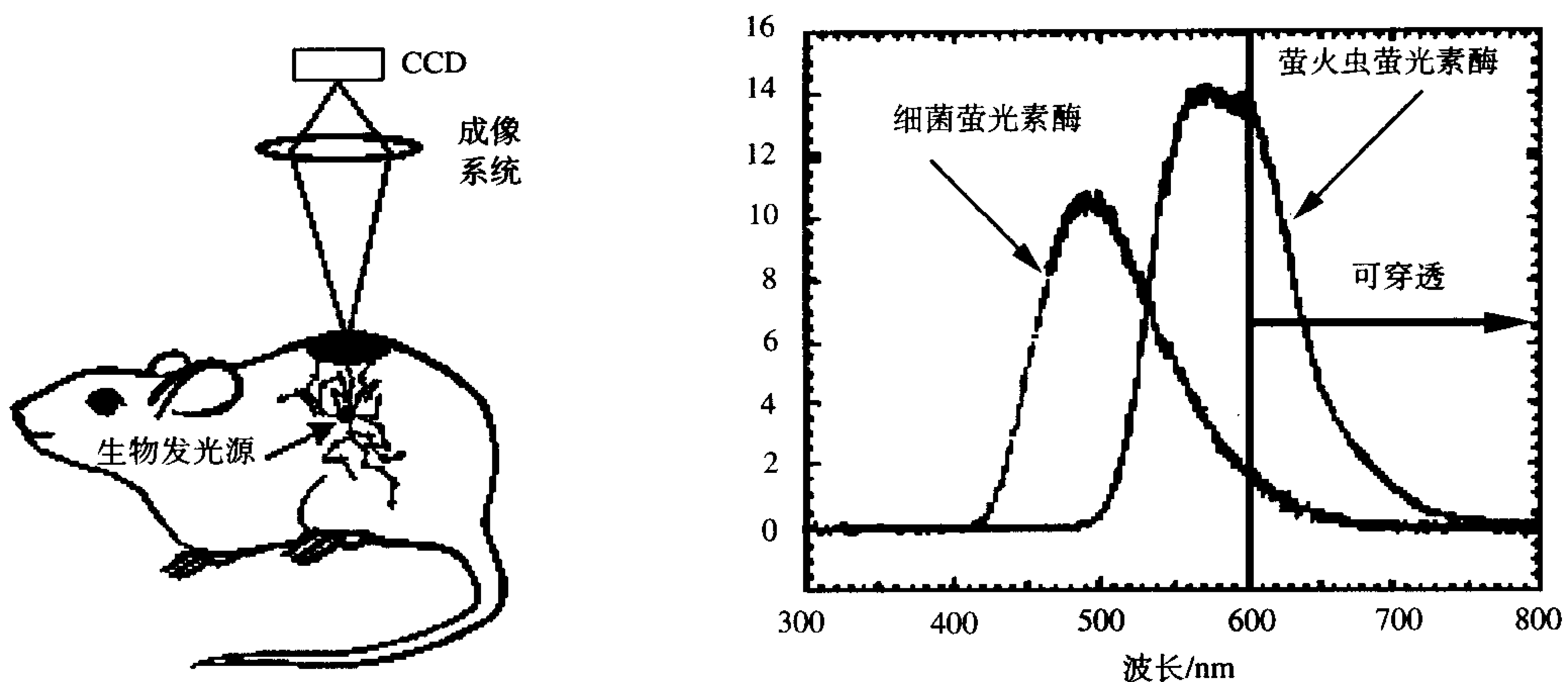


图 5.3　在波长大于 600nm 时，由老鼠体内发出的光是可以穿透皮肤而被检测到的

5.3.1.3　技术特性

相比较于目前的活体生物成像技术，如超声(ultrasound)、计算机断层摄影(computed tomography，CT)、磁共振(magnetic resonance imaging，MRI)、正电子衍射成像(positron-emission tomography，PET)、单光子衍射(single-photon-emission computed tomography，SPECT)等技术，体内可见光成像技术(optical imaging)包括生物发光(bioluminescence)与荧光(fluorescence)具有许多独特的优点，如操作简便、测量快速(不到5min)、同时可检测多个动物、费用低廉等。

1) 与荧光成像技术的比较

荧光发光需要激发光使得荧光团达到较高的能量水平，然后发射出较长波长的发射光。两种常见的荧光蛋白为：绿色荧光蛋白(green fluorescent protein，GFP)和红色荧光蛋白(Discosoma red fluorescent protein，DsRed)的发射光局限于可见光 400~650nm 范围。生物体内很多物质在受到激发光激发后，也会发出荧光，产生的非特异性荧光会影响到检测灵敏度。特别是当发光细胞深藏于组织内部，则需要较高能量的激发光源，也就会产生很强的背景噪声。

生物发光成像相对于荧光成像，其灵敏度高。作为体内报道源，生物发光较之荧光的优点之一为不需要激发光的激发，它是因酶和底物的特异作用而发光，且动物体自身不会发光，这样生物发光就具有极低的背景。虽然荧光信号强度远远超过生物发光，但极低的自发光水平使得生物发光的信噪比远高于荧光。另外，生物发光信号可以方便计量，即使标记细胞在动物体内有复杂的定位，也可从动物体表的信号水平直接得出发光细胞的数量(图 5.4)。而对于荧光，信号水平取决于发光细胞的数量及激发光的强度，如果光线穿过的组织对光线有强烈的吸收，这就使得荧光强度很难计量。萤光素酶在表达后快速合成并具有较短的寿命(萤光素酶在体内的半衰期为 3h)，其作为报道基因可实时反映细胞数量或启动子起始转录过程效率的变化。可根据两者所具有的特点以及实验要求如组织的光学条件(报道源的深度、体积及组织吸光度等)，选择适合的发光探针。

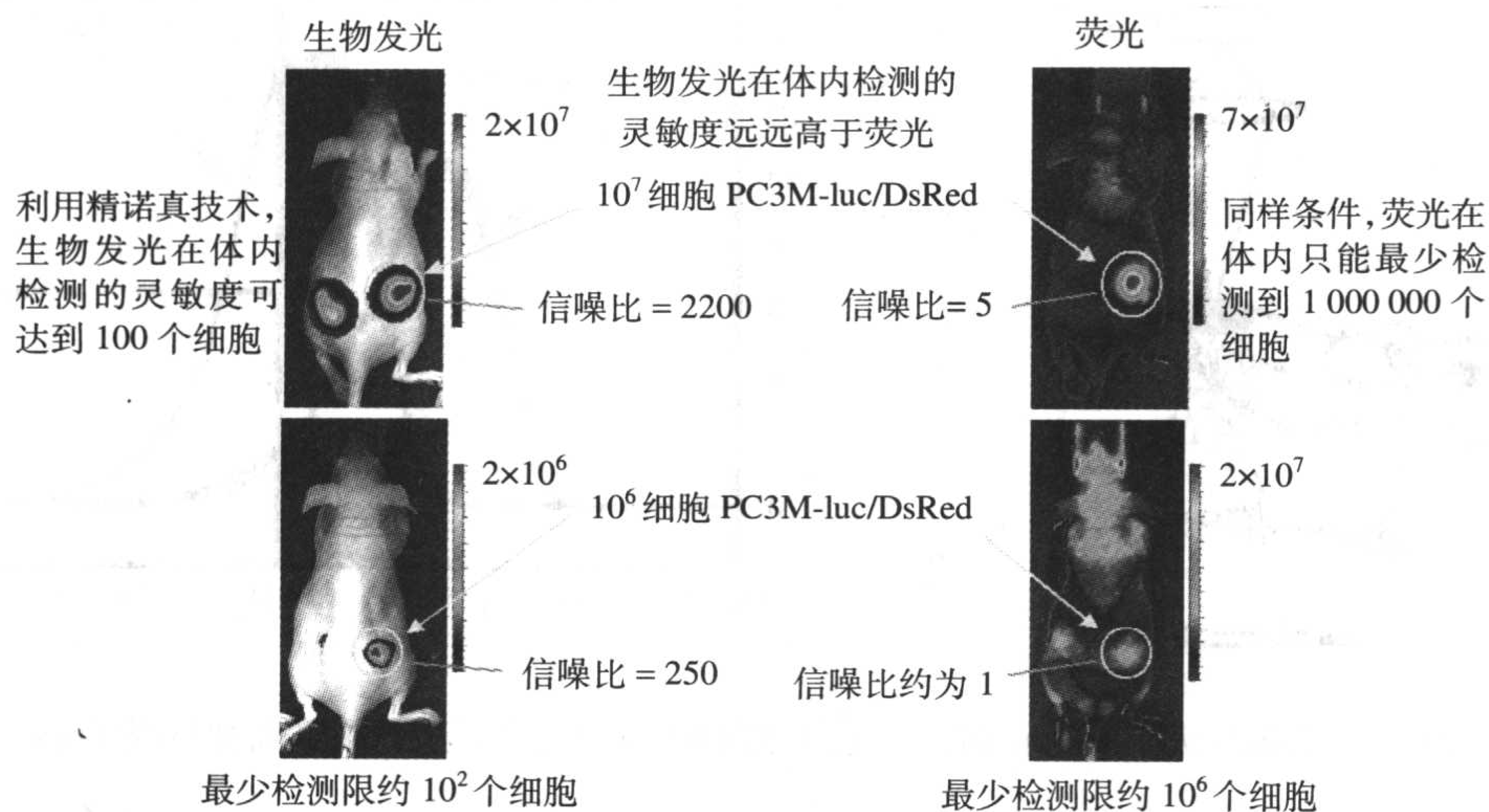


图 5.4　生物发光检测和荧光检测的比较

2) 功能成像与结构成像

MRI/CT 系统通常仅提供结构信息，而无法区分细胞不同的生理状态(如细胞是存活还是死亡)，而体内可见光成像不仅可以定位信号，更可获得有代谢活性细胞的数量。对于不能应用 MRI/CT 检测的软组织及细菌被检物，可见光成像技术均可对其灵敏检测。而且，将组织特异性基因启动子连接于生物发光或荧光报道基因上，可以检测该基因的表达及功能，开启了以发光转基因动物为模型的新研究领域。

5.3.1.4　仪器结构及参数

以精诺真公司的 IVIS 100 系统(图 5.5)为例，体内可见光成像系统主要由 3 部分组成。

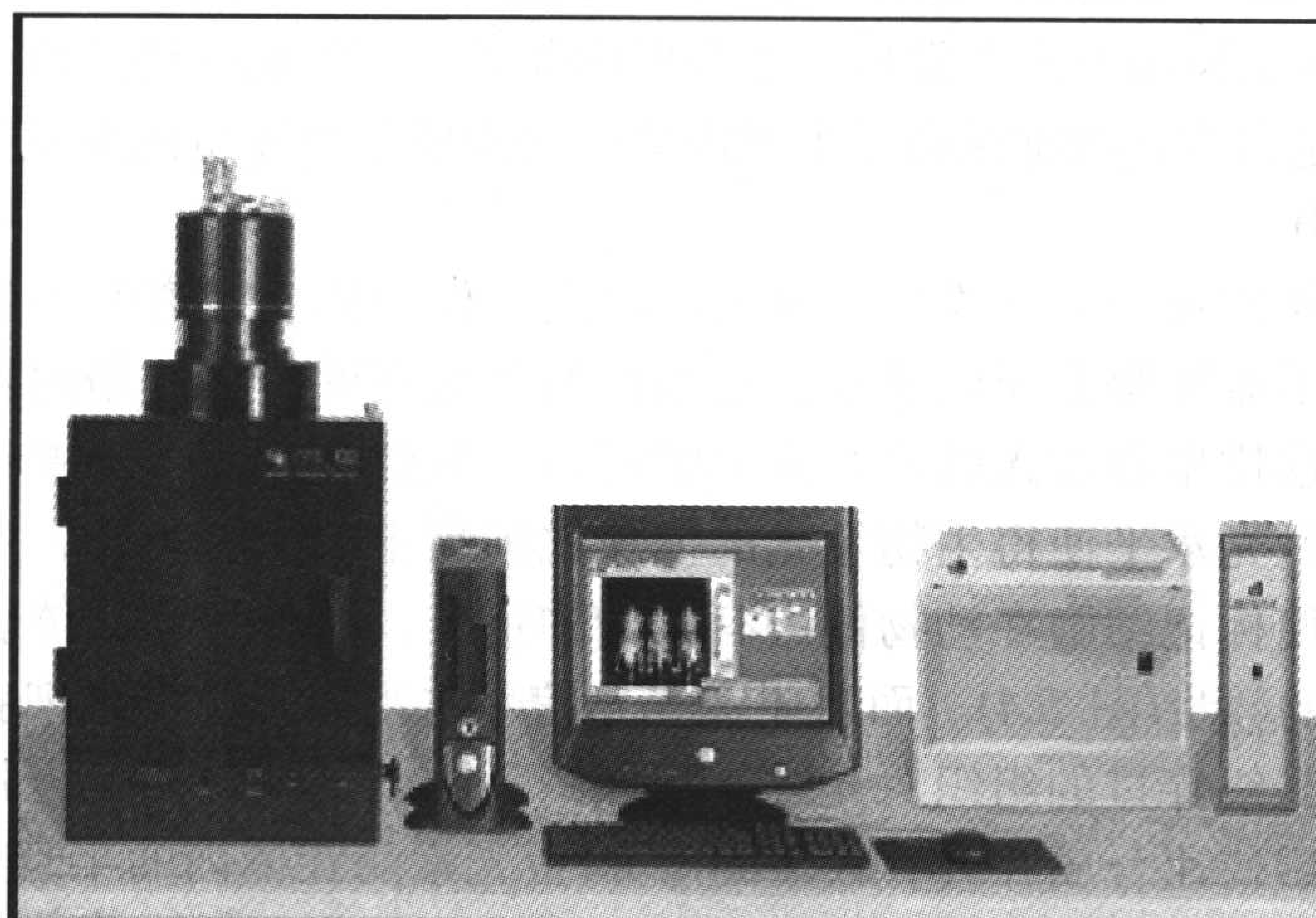


图 5.5　IVIS 100 成像系统

此系统包括：CCD 数码相机及成像暗仓，配备活体成像软件及高清晰度监视器的计算机，低温制冷系统，以及相机控制器

1) CCD 镜头

选择适当的 CCD 镜头，对于体内可见光成像是非常重要的。选用的 CCD 镜头对于波长大于 600nm 的光必须具有非常高的灵敏度和量子效率，而且由于需要探测的光源位于皮下几厘米处，其噪声信号要尽可能的小。应用于体内可见光检测的主要是电子计数加强型 CCD 镜头，它可以在噪声很低的情况下精确计数到单个光子。但大部分此类型 CCD 的量子效率在 450nm 时仅有 10%~15%，在 650nm 时迅速减小到低于 1%，如 Hamamatsu 公司的 C2400-30 系列。有些 CCD 如 iMultialkali 的 S20 在大于 600nm 时虽然有更高的量子效率，但其噪声很大并且其需要的冷却温度很低，实际操作中难以实现。因此现在怎样减少电子计数型 CCD 的噪声和获得更高的量子效率是仪器研发者特别关注的技术难点，解决这个问题需要开发出新型的光圈和滤光镜。

更为合适的 CCD 是制冷型的背照射 CCD。暗电流是 CCD 的噪声，在冷却到−105℃的条件下，暗电流可降低到一个可以忽略不计的程度。若用以前的技术要达到−105℃的低温需要液氮冷却，现在则有更好的低温设备可以方便地达到此温度。制冷型背照射 CCD 的信噪比可以达到成像技术要求，如信噪比为 10 时，读数噪声和暗电流可达到可以忽略不计的程度，并且量子效率也有非常好的表现。

2) 成像暗箱

由精诺真公司研制的体内可见光成像系统(IVIS)如图 5.6 所示。

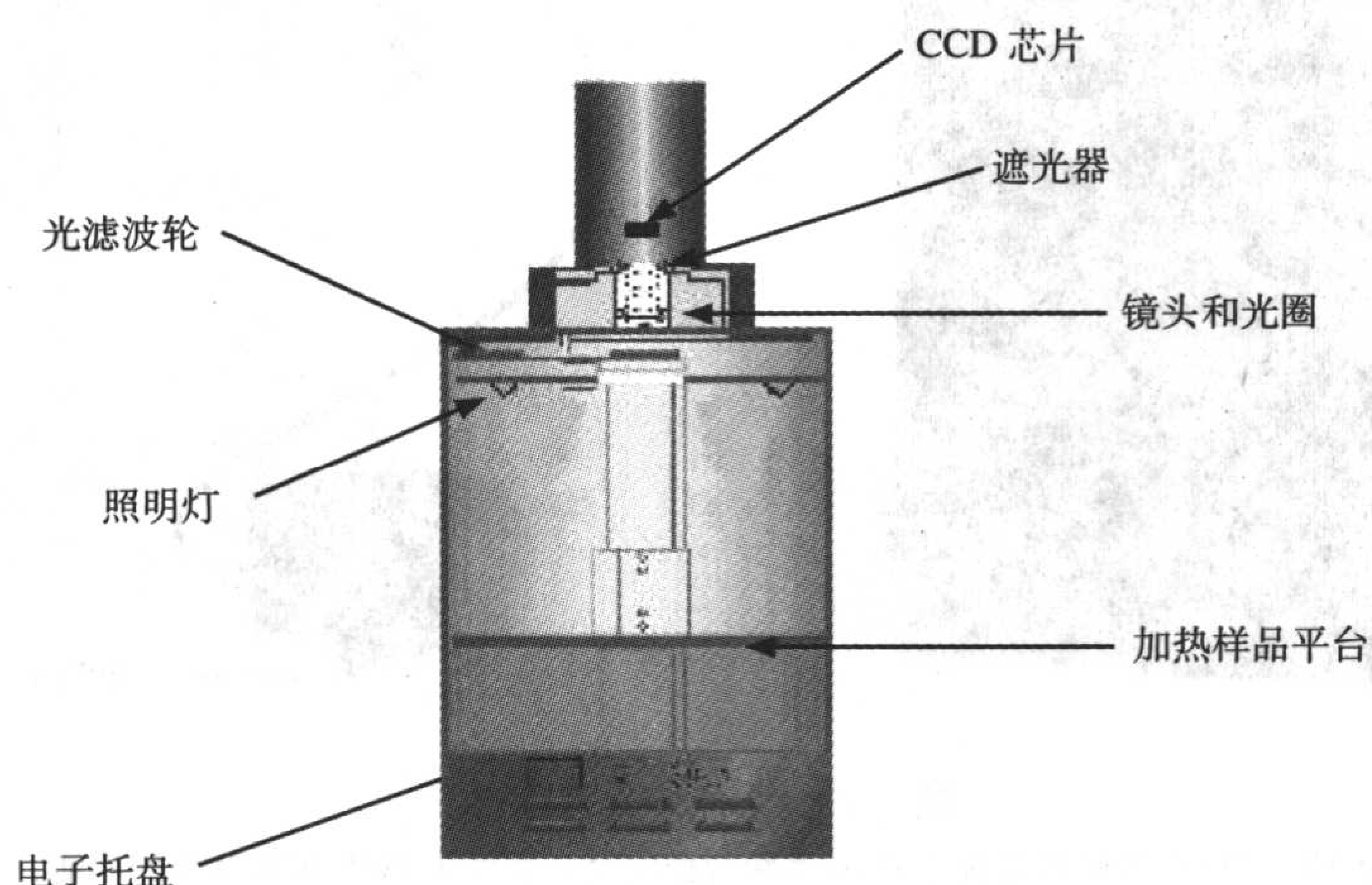


图 5.6　成像暗箱结构

成像暗箱屏蔽宇宙射线及一切光源，可以使暗箱内部保持完全黑暗，从而保证 CCD 所检测的光线完全由被检动物体内发出，而避免外界环境的光污染。CCD 镜头位于暗箱的顶部，光线通过光圈后被 CCD 收集。镜头下部是滤光镜安装环，可以根据应用的需要安装不同的滤光镜，扩展其光学成像能力。暗箱里的平台是由软件控制升降的，通过升降可以获得不同的 10~25cm 视野(field of view，FOV)，并且带有加热装置，可以持续观察试验动物的体温。

3) 软件系统

软件系统负责仪器控制和图像分析。软件控制镜头的焦距、曝光时间、滤光镜的更

换、照明灯的开启、平台的升降，且具有非常友好的用户界面，操作简便。

4) 其他可选装置

(1) 荧光附件

精诺真荧光附件(图 5.7)可连接于精诺真公司 IVIS100 或 IVIS50 成像系统，使系统在用于生物发光成像之外，还可用于体内荧光成像。精诺真 XFO 荧光附件拥有一个 12 位置激发光滤镜轮和一个 6 位置发射光滤镜轮。激发光滤镜轮用于选择合适的激发波长照射于观察样本上，发射光滤镜轮用于选择从样品发射出的较长波长的荧光波段。各种滤镜的选择由精诺真活体成像软件控制(图 5.8)。采用这套滤镜系统可有效地消除非特异性荧光的干扰。荧光附件采用 150W 石英卤素灯作为光源，激发光通过光学纤维传递到激发光滤镜后到达光分配盘，光分配盘可将激发光均匀的分布到整个成像暗仓。整套系统采用自发荧光极低的材料，尽量避免对实验动物荧光成像的干扰。

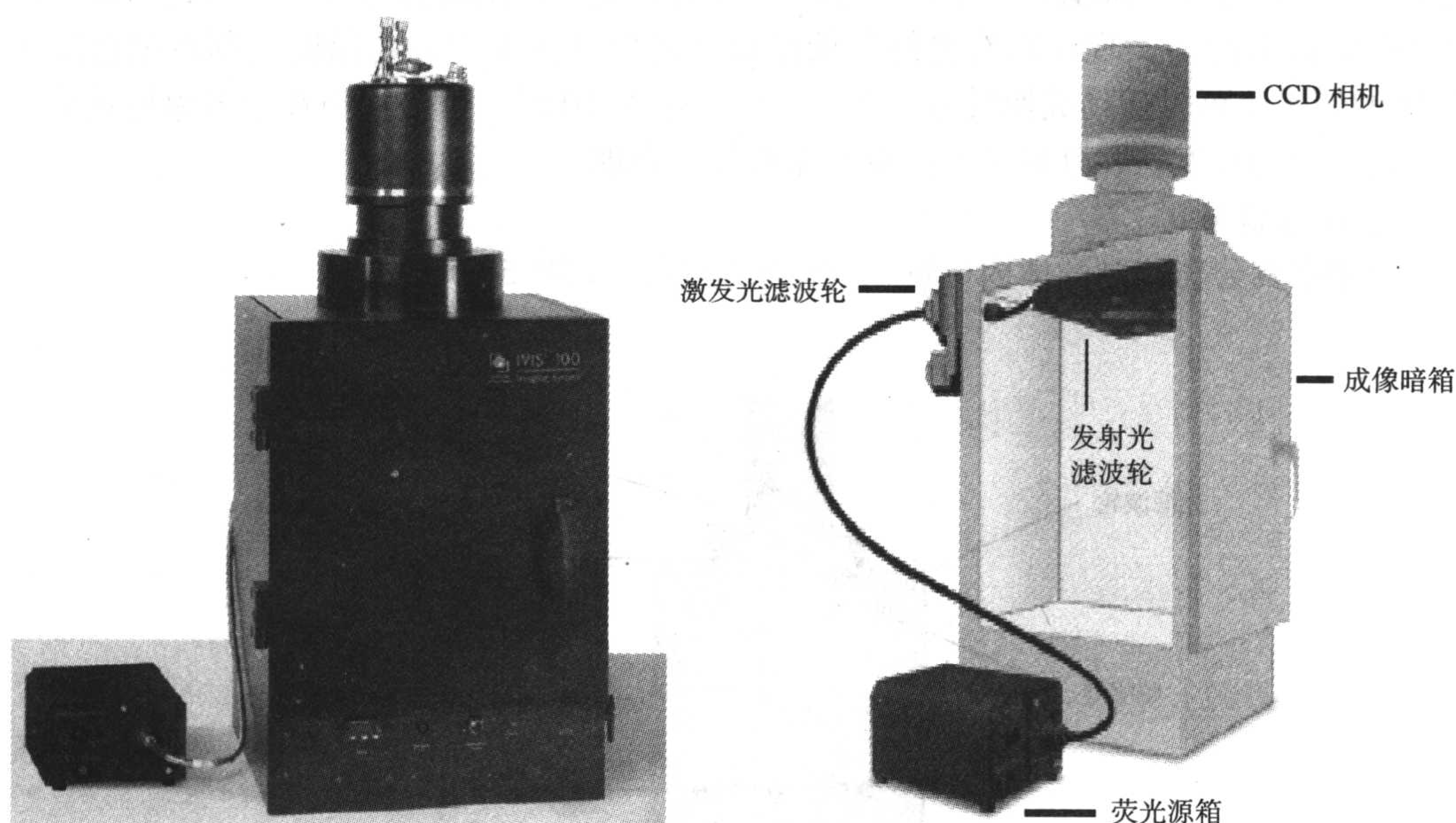


图 5.7 精诺真荧光附件

精诺真 XFO 荧光附件连接于 IVIS 系统成像暗仓，扩展了 IVIS 成像系统的功能，在生物发光成像之外也可用于荧光成像

(2) 麻醉系统

为了对实验动物进行可见光成像，需要将实验动物麻醉，以获得期望的观察角度及稳定的数据。精诺真公司的小动物 XGI-气体麻醉系统与 IVIS 成像系统配套使用(图 5.9)，为 IVIS 成像系统输送麻醉气体，并保证在成像过程中的麻醉气体渗漏尽可能少。在成像前，将大鼠或小鼠置入系统成像暗仓中并使之麻醉，然后放入成像暗仓中进行观察。输入成像暗仓的麻醉气体可分成 5 通道或 2 通道进行操作。

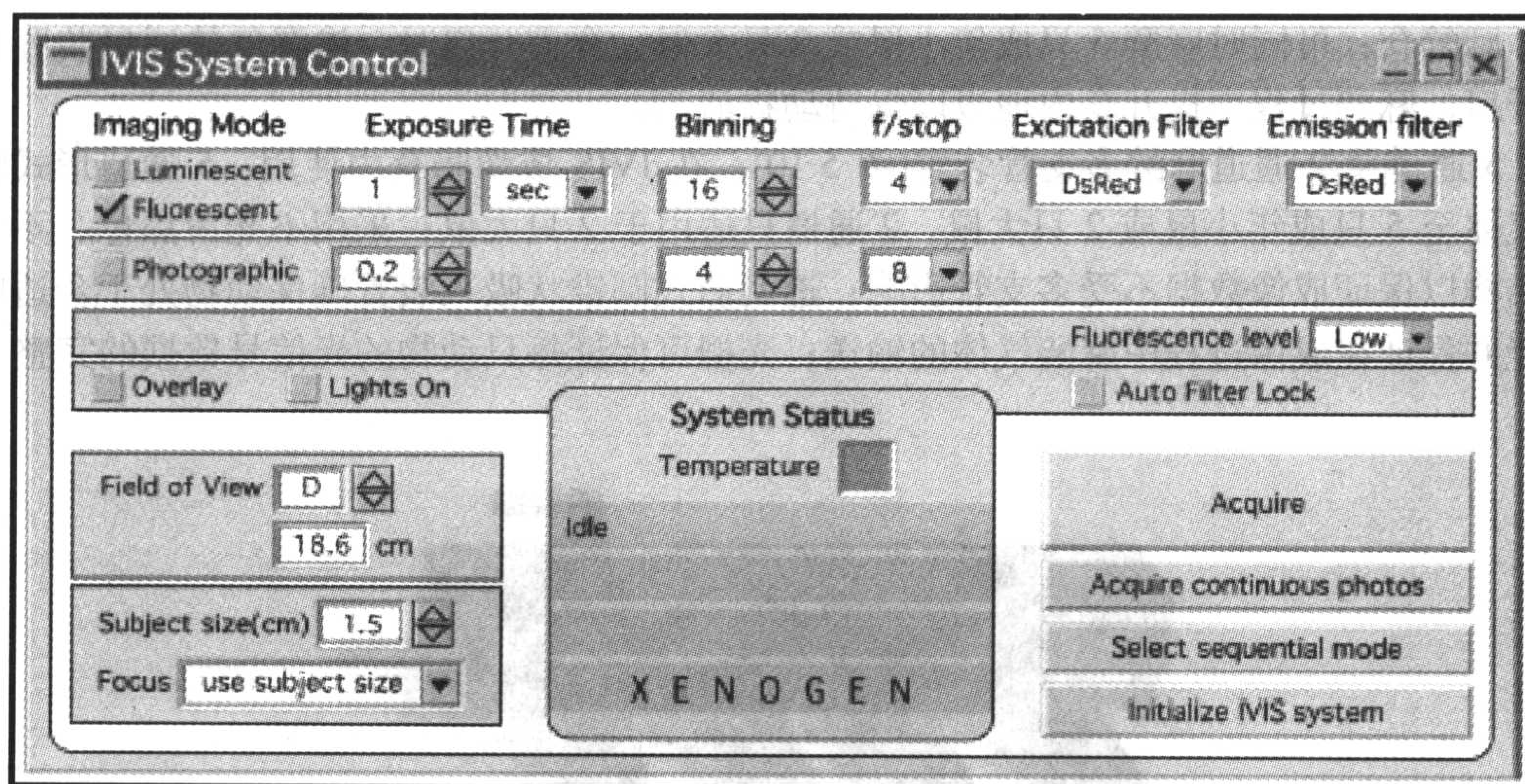


图 5.8　可见光成像软件控制相机与成像参数

成像软件为使用者提供荧光和生物发光成像之间相互转换的便捷操作模式

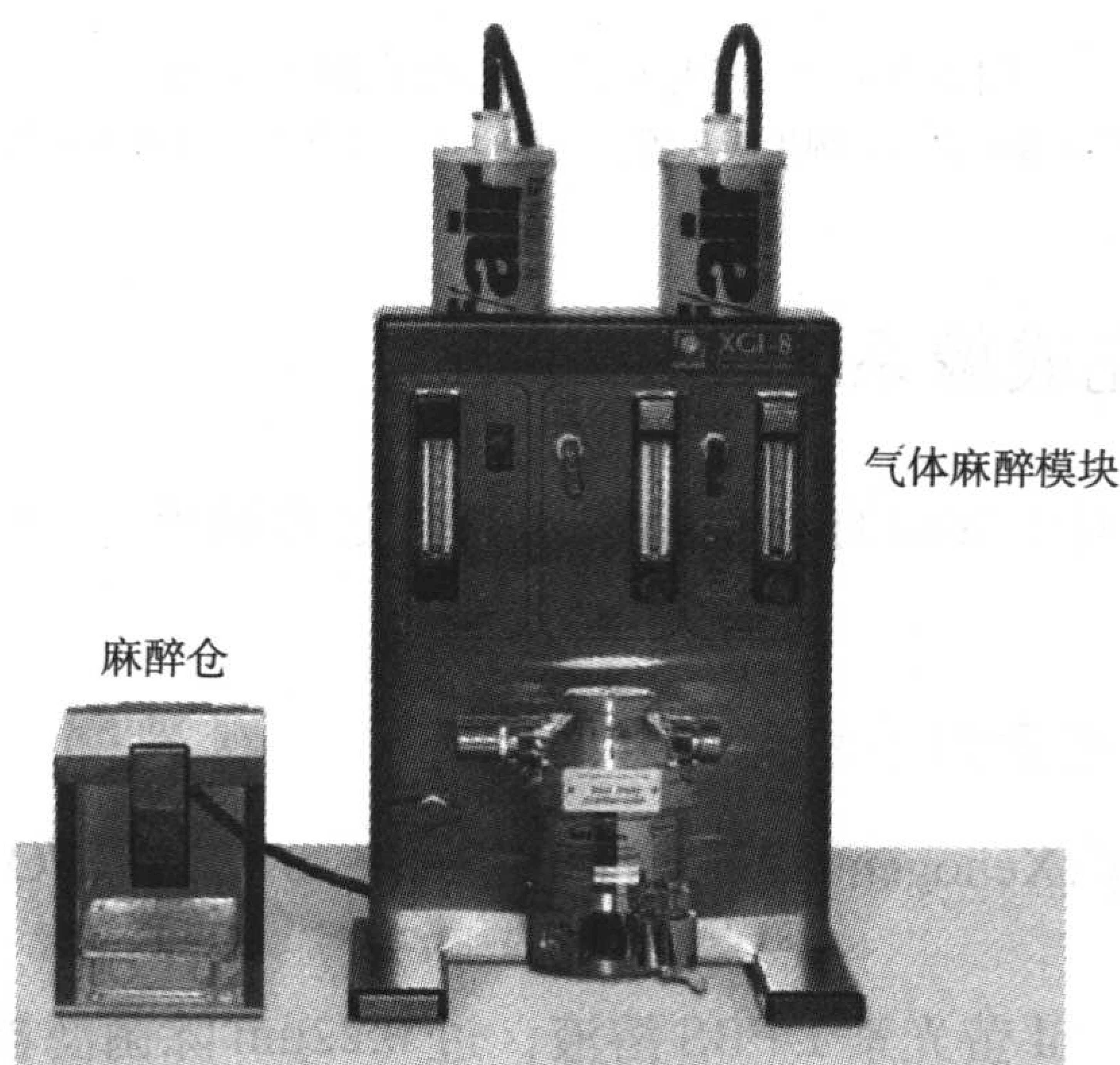


图 5.9　精诺真小动物 XGI-8 气体麻醉系统是 IVIS 成像系统的有机组成部分

系统组成包括：气体麻醉模块、异氟烷吸收过滤器、麻醉仓、小鼠或大鼠 5 通道麻醉多支管及大鼠 2 通道麻醉多支管。

气体麻醉模块能够高效地输送气体异氟烷(isoflurane)到麻醉仓或麻醉多支管。该装置可同时安全地麻醉 5 只成年小鼠或 2 只大鼠。该装置也包括废气清除途径以防止气体进入周围工作环境。开启麻醉仓盖的同时，系统会自动打开真空系统以使废气远离研究人员并进入免洗的异氟烷吸收过滤器，将废气排出系统及房间。该装置允许研究者独立控制并监测异氟烷在麻醉仓的作用，以及控制成像暗仓中动物的生理状态，并使得全程

的麻醉气体剂量保持在最适值。

麻醉仓：可同时麻醉 5 只成年小鼠或 2 只大鼠，仓盖开启时，渗漏气体通风装置自动开启，麻醉过程中提升仓内地板以保持动物清洁。

5 通道及 2 通道麻醉多支管装置(图 5.10)：在 IVIS 成像暗仓中使用；5 通道形式输送气体至 5 只成年小鼠或 2 只大鼠，2 通道只适用于 2 只大鼠；采用不光滑黑色、不发光结构以保证成像数据不受多支管影响；透明鼻式圆锥状吸入装置确保动物处于合适的位置并保证在成像过程中麻醉气体的输送；光栅可保证每只动物的光信号数据的完整。

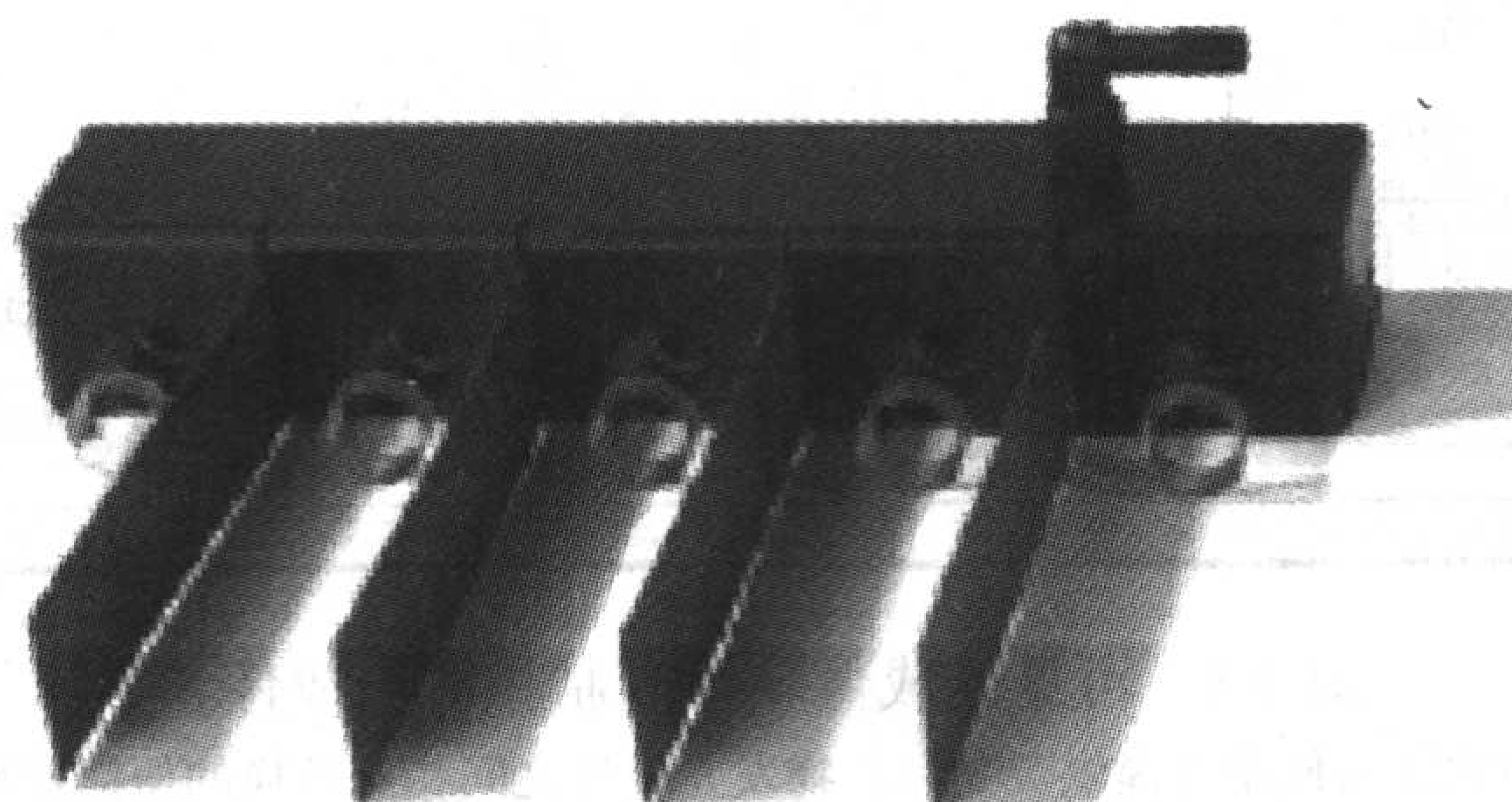


图 5.10　小鼠或大鼠 5 通道麻醉多支管

包括光栅及透明的鼻部圆锥吸入器，大鼠也可应用 2 通道麻醉多支管装置

5.3.2　体内可见光成像系统使用方法

体内可见光成像相对于其他的成像方法，其成像过程简单，快速(以 Xenogen IVIS 100 系统为例)。

5.3.2.1　配制底物萤光素溶液和注射实验动物

(1) 材料：D-萤光素(Xenogen Catalog#XR-1001)、DPBS、W/O Mg^{2+}、Ca^{2+}；0.22μm 针头滤器、注射器。

(2) 新鲜配制 15mg/ml 萤光素 DPBS 溶液，过 0.22μm 除菌滤器。

(3) 注射实验动物，用量为 10μl/g 体重，即 150mg 萤光素/kg 体重。例如，对于 10g 体重小鼠，注射 100μl，即 1.5mg 萤光素。

(4) 腹腔注射后 10~15min 后用成像系统观察。

注意：①萤光素溶液可先配制成 200 倍浓缩液置于−20℃保存，使用前稀释到 15mg/ml。②对同一只小鼠来说，注射不同量的萤光素，发光强度就不同，随着萤光素注射量的增多，发光也随之增强。③一般来说，萤光素腹腔注射老鼠后约 1min 后表达萤光素酶的细胞开始发光，10min 后强度达到最高。在最高点持续约 20~30min 后开始衰落，约 3h 后萤光素排除，发光全部消失，所以最佳的检测时间是在注射后 15~25min。但需要注意的是，对于不同的动物模型，发光动力学过程并不完全一致，最好先进行预

实验以确定何时发光信号最强。④荧光素注射位置最好选在左下腹部，对于非刺激性溶液，小鼠可很好地耐受 1ml。

(5) 麻醉实验动物：可采用异氟烷(isoflurane)或克他命/甲苯噻嗪(ketamine/xylazine)混合液麻醉实验动物。

a. 采用异氟烷来麻醉动物：

i. 称量异氟烷吸收过滤器的重量，看是否必要更换过滤器。当过滤器过重时，即代表吸附物过多，应及时更换；

ii. 确保氧气供应已切断，将蒸发器面板调至“OFF”位置，向蒸发器腔内注入异氟烷，不要超过最大刻度指示线；

iii. 打开氧气罐阀门，保证压力为 55psi 左右；

iv. 将氧气流速调为 1L/min；

v. 将动物放入麻醉仓，盖好盖子；

vi. 打开麻醉仓管道阀门(确保麻醉多支管阀门处于关闭状态)；

vii. 将蒸发器面板刻度调到 3%(动物在 1~2min 后就会被麻醉)；

viii. 轻晃麻醉仓，当动物无反应时，将蒸发器面板刻度调到 1.5%~2%；

ix. 将麻醉多支管阀门打开；

x. 迅速打开麻醉仓，取出实验动物，将圆锥吸入器套上；

xi. 关闭麻醉仓管道阀门；

xii. 开始进行成像操作或接种细胞。

注意：①一旦停止麻醉气体供应，动物会在几分钟内苏醒；②本麻醉系统仅适用异氟烷麻醉，使用其他麻醉剂可能会导致危险；③在处理剩余的麻醉剂时实验室要具备良好的通风条件，建议遵照已公布的安全条例进行操作；④XGI 麻醉系统要始终保持直立状态；⑤当成像或接种细胞结束后，关闭氧气阀和麻醉多支管装置阀门。

b. 克他命/甲苯噻嗪混合液麻醉动物：

i. 将克他命(100mg/ml)和甲苯噻嗪(20mg/ml)按体积比 4∶1 混合。

ii. 采用肌肉注射方式，克他命和甲苯噻嗪的剂量分别为 120mg/kg 体重和 6mg/kg 体重，即每克体重注射 1.5μl。

iii. 麻醉剂一般在注射后 2~3min 后起作用，如有必要，可再注射 1 次，用量为每克体重注射 0.7μl。

注意：①注射一次麻醉剂，动物的苏醒时间大约在 60~90min，多次注射则苏醒时间会更长(4h 以上)；②多次注射可能会使动物过度麻醉。

(6) 成像系统的使用。

a. 系统启动：打开电脑主机和监视器；打开 IVIS 成像系统；当电脑显示桌面后，打开活体成像软件；按照提示输入用户 ID(最多 3 个字面)，然后点击“Done”；点击镜头控制面板的“Initialize”按钮初始化系统；等待系统进行初始化，可以听到马达运转的声音和看到系统状态显示发生变化；等待镜头达到它的工作温度(参看“工作温度”)，直到镜头控制面板上绿灯亮；此时镜头温度被锁定在工作温度−105℃，就可以进行操作了。

b. 在成像暗箱门下方是平台加热控制按钮，停止按钮，手动光照控制按钮和镜头

状态指示灯。具体操作如下：

i. 平台温度控制器：改变平台的温度，并且可以显示平台的摄氏温度或华氏温度。平台温度预设为37℃，按下“set”按钮可以看到平台的实时温度，持续按住“set”按钮的同时按上下按钮可以改变平台温度，注意：如果改变的幅度过大，平台可能最多需要45min的加热时间。

ii. 停止按钮：可以立刻停止成像暗箱内部所有4个马达的运转。

注意：只有当发生严重故障时停止按钮才可以被按下，如当平台上升过程中，承载的样品过高可能会损坏成像暗箱时。按下停止按钮后，如需重新启动系统，请按照程序启动系统并进行初始化。切断IVIS系统的电源，等待5s，重新接通电源，点击镜头控制面板上的初始化按钮，完成初始化程序后就可以进行成像操作了。

iii. 光照强度控制旋钮：使用此旋钮可以改变成像暗箱内部LED的光照强度，这个LED是用来照亮样品用的。LED的开关是成像软件的镜头控制面板的“Light On”按钮。通过旋转按钮调整需要的光照强度，旋钮分十阶并有铃声提示，当达到所需的光照级别后，取消勾选镜头控制面板的“Light On”可以关掉LED。

iv. 状态指示灯：指示是否可以打开成像暗箱门，只有当绿灯亮时才可以打开。一定不要在红灯亮时打开暗箱门。

(7) 气体麻醉：IVIS系统包含一个麻醉气体控制装置，在成像暗箱的后面有2个0.25英寸的进气口和出气口，暗箱的右边是控制开关，暗箱内也有2个0.25英寸的出气口和进气口分别位于样品台的左后和右后方。

注意：请仔细确认暗箱内的管道或其他固定装置不会发出荧光，使用者在进行成像操作前请测试这些管道和装置。

(8) 暗箱门的操作：IVIS成像暗箱只需使用很轻的力即可牢固锁住箱门。请定期检查箱门的锁紧系统是否工作正常。连接IVIS成像系统成像暗箱平台的挡帘可以遮盖住平台下部的空间，这个挡帘提醒使用者不要在平台下放任何物品。

(9) 成像前基本准备：

a. 黑色垫纸：尽管平台是经过黑色电镀处理的，但还是建议使用者在成像时在平台上垫一张高品质的黑色垫纸，特别当测试的是生物样本时。高品质黑色垫纸可以有效的阻止光反射，并且可以保持平台清洁。

b. 将成像物品置中：将样品放置在成像平台正中，关上暗箱门，勾选镜头控制面板上的“Live”按钮，监视器上将显示样品的图像。如果样品已经置中，取消勾选“Live”按钮后就可以进行成像操作了，如果偏离中心，点击“Live”按钮后，打开箱门，调整样品的位置，重复上述步骤直到在监视器上看到样品图像。

c. 发光材料：使用者请牢记“任何物体都会发荧光”，大部分塑料，几乎所有的磁带、植物、染料、吃的食物(大部分是植物)、鼠尿、动物窝里的草垫都已经被证实可以发荧光，采用荧光成像时应尽量避免这些物质的污染。使用者操作IVIS成像系统时应戴上手套。

(10) 系统关闭程序：不建议在1天内多次开关系统，每天凌晨，通常是早上4~6点，IVIS系统会自动进行背景测量和系统自检。如果必须关闭系统，一定要严格按照以下步

骤进行。

a. 保存实验结果，关闭活体成像软件。

b. 关闭 IVIS 成像暗箱。

c. 关闭 Windows 操作系统。

注意：体内可见光成像技术是精诺真公司的专利技术(专利号：95198006.8)，如使用需获得专利实施许可。

5.3.3 体内可见光成像技术在干细胞研究方面应用

采用体内可见光成像系统，可以观测到实验动物体内肿瘤的发展进程以及药物治疗所产生的反应，示踪干细胞和淋巴细胞，并广泛应用于细菌和病毒学研究、利用转基因动物进行基因表达研究、siRNA 研究、细胞凋亡研究、蛋白质相互作用研究等领域。以下将简单介绍其在干细胞研究方面的应用。

5.3.3.1 人造血干细胞重建小鼠造血系统

研究造血干细胞移植的试验性骨髓模型的标准方法，是在受体动物死后检测骨髓中供体细胞的数量。采用这种方法，每 1 只实验动物只能提供 1 个时间点的数据。应用体内可见光成像技术可长期和动态地显示人造血干细胞的异种移植情况。利用表达萤光素酶的慢病毒载体(lentiviral vector)可明显地区分人 $CD34^+$和 $CD34^+/CD38^-$细胞群在受体 NOD/SCID 小鼠骨髓中的增殖能力。成像数据显示，$CD34^+$细胞在植入后的早期(13天)会出现一个峰值，随后信号很快减弱。而对于更原始的 $CD34^+/CD38^-$细胞，植入后则出现较长时间的潜伏期，但在 36 天时，供体细胞的数量已大大超过相应地植入 $CD34^+$细胞群的情况(图 5.11)。

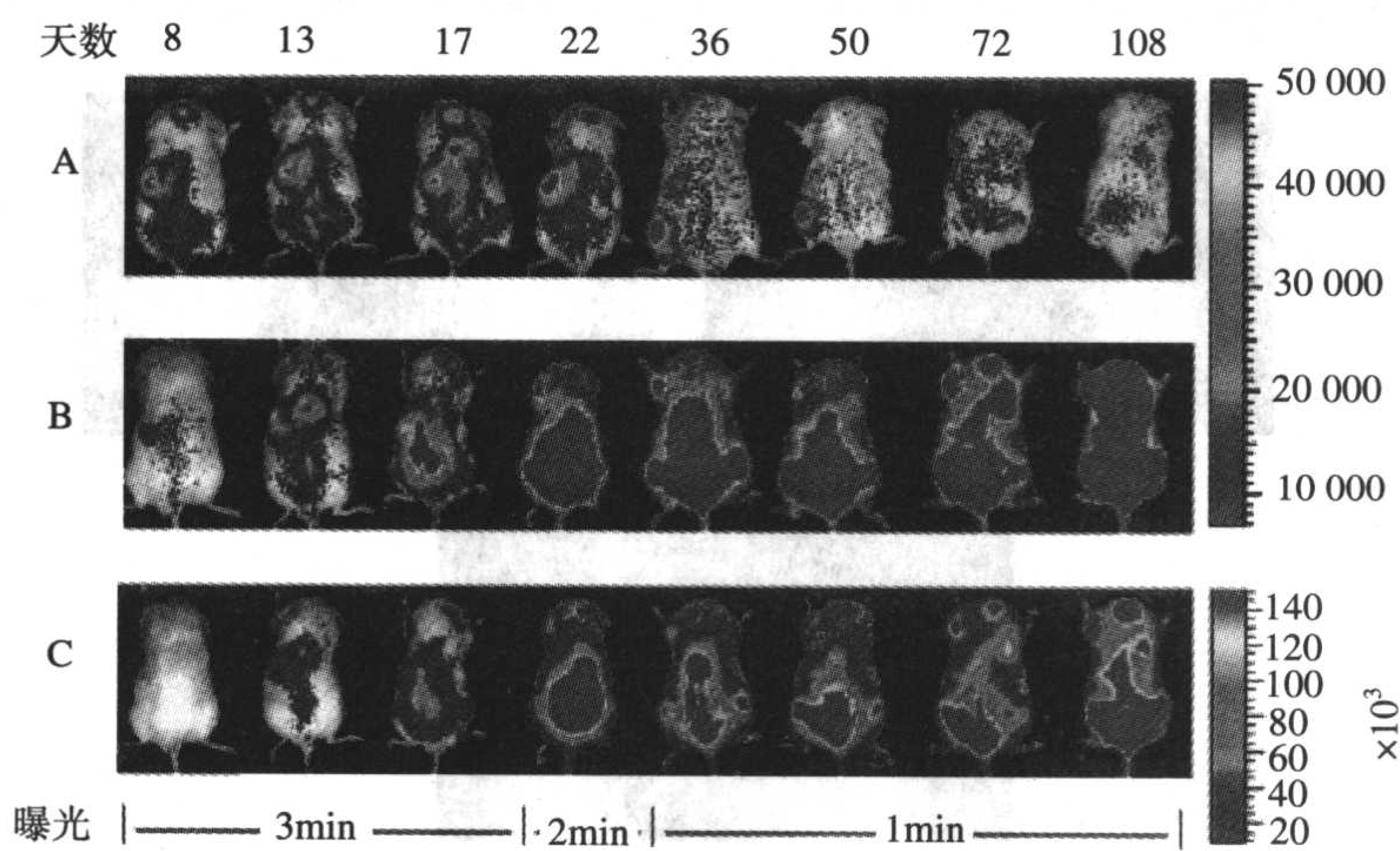


图 5.11 萤光素酶标记的不同分化程度的人 HSC 植入受体小鼠后，植入细胞群随时间的变化情况

A. 植入 $CD34^+$；B. 植入 $CD34^+CD38^-$；C. 与 B 为同 1 只小鼠。通过成像软件改变标尺以便更加清晰地分辨发光部位

5.3.3.2 小鼠造血干细胞重建同种受体小鼠的造血系统

从表达萤光素酶的转基因小鼠分离出的造血干细胞可用于小鼠的同种移植研究。Cao 等利用分离出的表达萤光素酶的造血干细胞来研究植入经辐射处理受体鼠的早期事件和增殖动力学。在移植后的早期，造血干细胞产生离散的聚集点，分别分布在脾和骨髓部位。早期可检测到的聚集点随后会扩大，形成新的聚集点或以不同的速度消失。这些研究结果揭示了高度纯化的 HSC 动态的和不同的增殖模式，并证明单个的 HSC 对造血系统重建的最终贡献的程度与其早期的定位和增殖无关(图 5.12)。

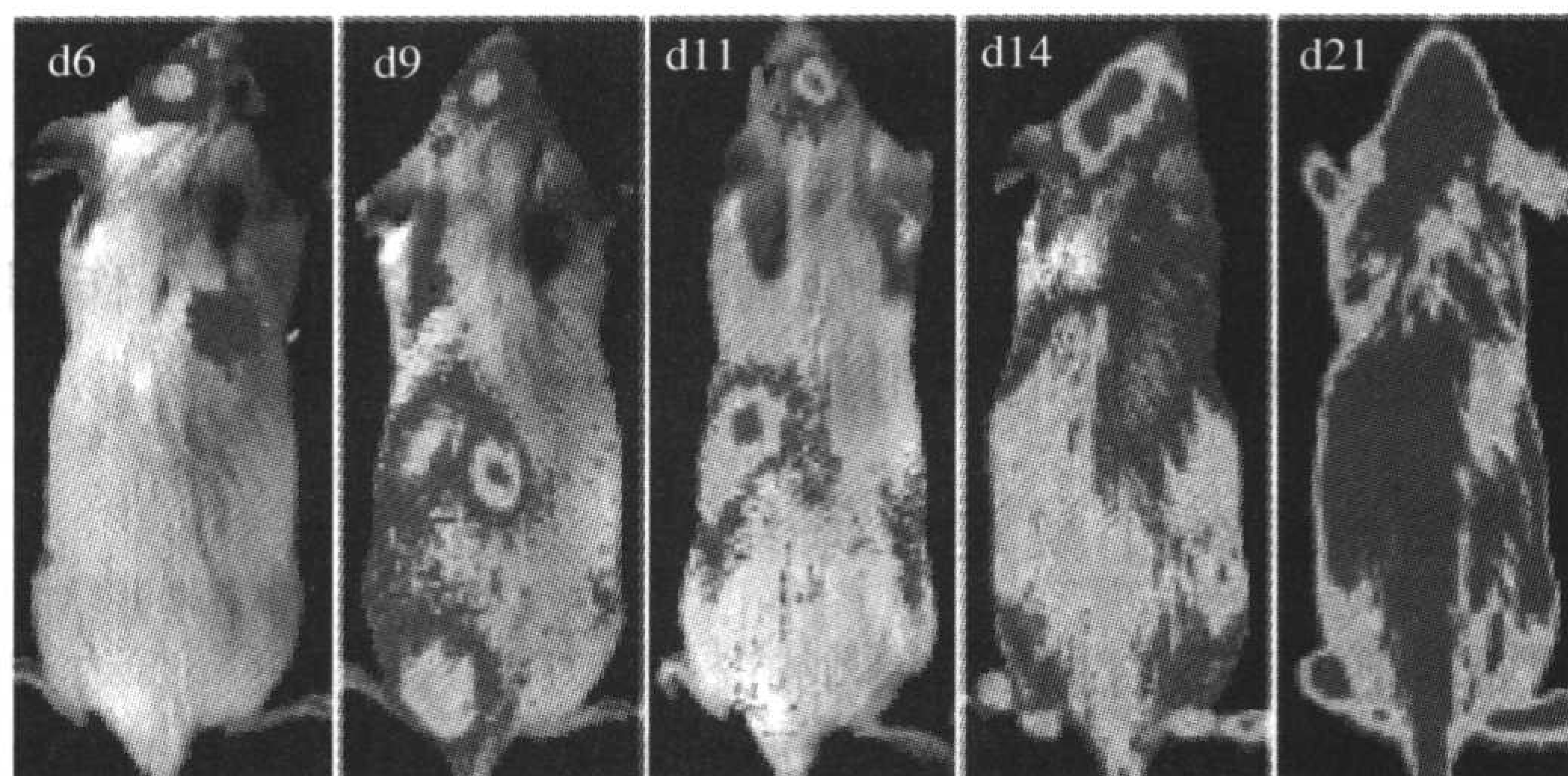


图 5.12 在一只受体小鼠体内植入 250 个萤光素酶标记的造血干细胞后，供体细胞群随时间变化的情况

第 6 天时，出现两个发光点；第 9 天，出现了新的发光点；随后这些新出现的发光点的发光强度减弱或消失(11 天)，而在脾部的信号强度稳定增加；到 21 天时整只受体小鼠体内分布有大量的供体细胞

5.3.3.3 神经祖细胞用于胶质瘤的治疗

非侵入性地跟踪神经祖细胞(neural progenitor cell，NPC)的迁移、植入和增殖具有重要

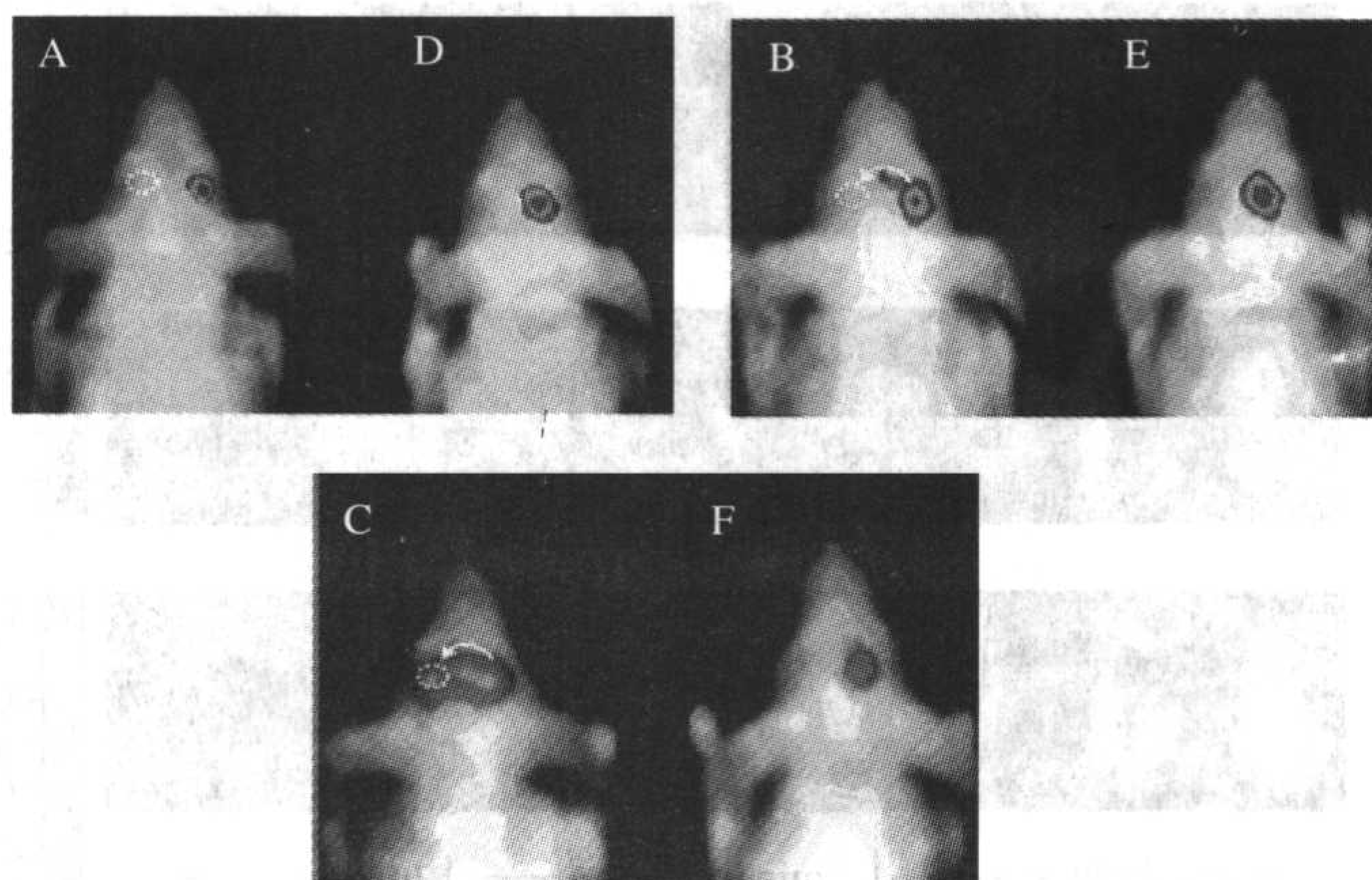


图 5.13 标记萤光素酶基因的 NPC 细胞植入到长有 Gli36 胶质瘤(用点状圈表示)小鼠(A~C)或对照小鼠(D~E)的右侧脑半球

A、D 显示植入部位，B、E 和 C、F 分别为第 1 周和第 2 周时的情况，详细信息请参考 www.longmed.com

的临床和研究价值。Tang 等利用体内可见光成像技术研究了 NPC 植入受体裸鼠后向受体鼠脑部胶质瘤部位移动的情况。用萤光素酶基因稳定转染 C17.2 NPC 后，再将细胞注射到胶质瘤的对侧脑实质，采用体内可见光成像技术，可观察到 NPC 跨过胼胝体移动到肿瘤部位(图 5.13)。

(王 俊 张 鹏)

主要参考文献

迟晓春，陈曦，杨京京等. 2004. 显微注射技术的改进和用灵长类间充质干细胞制备嵌合体小鼠. 解剖学杂志，27(2): 207~209

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature, 301(5900): 527~530

Cao YA, Wagers AJ, Beilhack A et al. 2004. Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. PNAS, 101(1): 221~226

Contag PR, Olomu IN Stevenson D K et al. 1998. Bioluminescent indicators in living mammals. Nat Med, 4(2): 245~247

Edinger M, Cao YA, Vemeris MR et al. 2003. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using *in vivo* bioluminescence imaging. Blood, 101(2): 640~648

Hardy J, Francis KP, DeBoer M et al. 2004. Extracellular replication of Listeria monocytogenes in the murine gall bladder. Science, 303(5659): 851~853

Jenkins DE, Dei Y, Horning YS et al. 2003. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. Clin Exp Metastasis, 20: 733~744

Laxman B, Hall DE, Bhojani MS et al. 2002. Noninvasive real-time imaging of apoptosis. PNAS, 99(26): 16551~16555

Luker GD, Prior JL, Song J et al. 2003. Bioluminescence imaging reveals systemic dissemination of herpes simplex virus type 1 in the absence of interferon receptors. J Virol, 77(20): 11082~11093

McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT et al. 2002. RNA interference in adult mice. Nature, 408: 38~39

Paulmurugan R, VmezawaY, Gambhir SS. 2002. Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies. PNAS, 99(24): 15608~15613

Phillips RA, Spaner DE. 1991. The scid mouse: mutation in a DNA repair gene creates recipients useful for studies on stem cells, lymphocyte development and graft versus host disease. Immunol Rev, 124(12): 63~74

Robin Lovell-Badge. 2001. The future for stem cell research. Nature, 414(1): 88~91

Stewart CL. 1993. Production of chimeras between embryonic stem cells and embryos. Methods in enzymolory, 225: 823~855

Tang Y, Shah K, Messrli SM et al. 2003. *In vivo* tracking of neural progenitor cell migration to glioblastomas. Hum Gene Ther, 14(13): 1247~1254

Troy T, Jekic-McMullen D, Sambucetti L et al. 2004. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminscent reporters in animal models. Mol Imaging, 3(1): 9~23

Wang XL, Rosol M, Ges et al. 2003. Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using *in vivo* bioluminescence imaging. Blood, 102(10): 3478~3482

Zhang N, Weber A, LiB et al. 2003. An inducible nitric oxide synthase-luciferase reporter system for *in vivo* testing of anti-inflammatory compounds in transgenic mice. J Immunol, 170: 6307~6319

Zhang W, Purchio AF, Chen K et al. 2003. A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying *in vivo* transcriptional regulation of the human *CYP3A4* gene. Drug Metab Dispos, 31(8): 1054~1064

第 6 章　干细胞增殖、分化及其调控的分析检测

6.1　干细胞细胞周期检测技术

6.1.1　细胞周期概述

细胞周期是指连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个序贯过程。细胞周期可分为 4 个时期：S 期(DNA 合成期)、M 期(有丝分裂期)、G_1 期(M 期结束到 S 期之间的间隙)、G_2 期(S 期结束到 M 期之间的间隙)。细胞在细胞周期中顺序经过 G_1 期→S 期→G_2 期→M 期。

有些细胞处于休眠状态，暂时脱离细胞周期、不进行增殖，但是在适当刺激下可重新进入细胞周期，这些细胞称为 G_0 期细胞。

终末分化细胞是指那些不可逆地脱离细胞周期、丧失分裂能力、保持生理机能活动的细胞，如神经、肌肉、多形核白细胞等。

细胞增殖是受到严密调控的生命过程。主要的调节分子包括：① Cyclin 即周期蛋白；② Cdk 即“周期蛋白依赖性激酶”；③ Cdk 抑制剂。

细胞周期及其调控是目前生命科学的前沿问题(翟中和等 2000)。

6.1.2　干细胞与细胞周期

干细胞是指具有多向分化潜能和自我更新能力的细胞。

干细胞既可以从胚胎中分离得到，也存在于多种成体组织中。

干细胞的细胞周期从本质上说并无特殊之处，但是受精卵(可以视为全能干细胞)的细胞周期没有 G_1 期，从成体组织中分离得到的干细胞往往处于 G_0/G_1 期。

6.1.3　细胞周期的检测(Pagano et al. 2000)

6.1.3.1 细胞计数

1) 试剂

0.25%胰蛋白酶溶液、无血清培养液。

2) 设备

显微镜、计数板。

3) 操作规程

(1) 准备计数板：用乙醇清洁计数板和专用盖玻片，用绸布轻轻擦干。

(2) 制备细胞悬液：制备单个细胞悬液。本法要求细胞密度不低于 10^4 个/ml。如果

细胞数很少，应将悬液离心，重悬浮于少量培养液中。

(3) 加样：用吸管轻轻吹打细胞悬液，取少许细胞悬液，在计数板盖玻片的一侧加微量细胞悬液，加样量不要溢出盖玻片，也不要过少或带气泡。

(4) 计数：在显微镜下，用 10×物镜观察计数板四角大方格中的细胞数。细胞压中线时，只计左侧和上方者，不计右侧和下方者。

计算：细胞数/毫升原液 = (4 大格细胞数之和/4)×10^4×稀释倍数。

4) 注意事项

(1) 消化单层贴壁细胞，要分散良好。

(2) 取样计数前，应充分混匀细胞悬液。在连续取样计数时尤其要注意这一点。

镜下计数时，遇见 2 个以上细胞组成的细胞团，应按单个细胞计算。如细胞团占 10%以上，说明消化不充分，或细胞数少于 200 个/$10mm^2$ 或多于 500 个/$10mm^2$ 时，说明稀释不当，需要重新制备细胞悬液。

5) 结果判读

一般根据计数结果能够绘制出细胞的生长曲线，从而算出倍增时间。值得注意的是，倍增时间只能反映细胞周期，但是并不等同于细胞周期。

6.1.3.2 细胞生长曲线

1) 原理

只有生长稳定的细胞才能绘制细胞生长曲线(司徒镇强等 1996)。

此处介绍用 MTT 法来进行生长曲线测定的方法。

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物(formazan)并沉积在细胞中，而死细胞则无此功能。DMSO 能溶解细胞中的紫色结晶物，用酶联免疫检测仪在 490nm 波长测定其 *OD* 值，可以间接反映活细胞数量。在一定范围内，MTT 结晶物形成的量和细胞数成正比。此方法灵敏度高、重复性好、操作简单且没有放射性污染。

2) 试剂

(1) MTT 溶液：称取 250mg MTT，加入 50ml PBS(0.01mol/L，pH7.4)，磁力搅拌 30min，用 0.22μm 的滤器除菌，分装，4℃保存。2 周内有效。

(2) 含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液、0.25%胰蛋白酶、DMSO。

3) 设备

显微镜、振荡仪、酶联免疫检测仪、96 孔培养板、移液器、吸管、离心管。

4) 操作规程

(1) 接种细胞、培养细胞。

(2) 呈色：培养 3~5 天后，每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml)20μl，37℃继续孵育 4h，终止培养，小心吸弃孔内培养上清液。对于悬浮培养的细胞，需要离心、弃去孔内培养液。每孔加入 150μl DMSO，振荡 10min，使结晶物充分溶解。

(3) 比色、记录结果。以时间为横轴、光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。

5) 注意事项

(1) 选择适当的细胞接种浓度。在进行 MTT 试验前，对细胞要测定其贴壁率、倍增

时间和不同接种细胞数时的生长曲线，然后确定试验中每孔的接种细胞数和培养时间，以保证培养终止时不致细胞过满。这样才能保证 MTT 结晶形成的量与细胞数呈良好的线性关系。

(2) 避免血清干扰。一般选择小于10%胎牛血清的培养液进行试验。在呈色后，尽量吸净培养孔内残余的培养液。

(3) 设定空白对照。与试验孔平行设不加细胞只加培养液的空白对照孔，其他试验步骤保持一致。最后呈色时，以空白孔为零。

6) 结果判读

细胞周期与细胞群体倍增时间是不同的概念。倍增时间是指在对数生长期细胞数量增加 1 倍所用的时间，这一时间内一般有些细胞参与分裂，有些细胞可能不分裂，有些可能分裂两次或数次，但是细胞总数增加 1 倍。一般来说，细胞周期短于细胞倍增时间。

6.1.3.3 流式细胞术

6.1.3.3.1 原理

流式细胞仪能够分析细胞或颗粒物的各种参数，如 DNA、RNA、蛋白质含量及这些物质在细胞周期中的变化。

用 DNA 直方图可以得到细胞周期中各时相细胞的百分比及 DNA 含量。G_0/G_1 期细胞的 DNA 含量是 $2n$，G_2/M 期细胞的 DNA 含量是 $4n$，S 期细胞的 DNA 含量介于 $2n$ 和 $4n$ 之间。

在细胞周期中用 PI 单独染色无法将 G_0、G_1 期细胞分开，可以用 DNA/RNA 双染色将两者分开，这是因为 G_0 期细胞不合成 RNA。

流式细胞仪还能够定量细胞总蛋白、定量细胞特定功能蛋白、定量细胞内钙离子等，结合细胞周期的检测，可以观察这些物质在细胞周期中的变化(刘智广 2000)。

6.1.3.3.2 操作规程

1) 制备单个细胞悬液

(1) 悬浮生长细胞。用 PBS 洗涤、配制成 1×10^6~2×10^6 个/ml 的细胞悬液备用。

(2) 单层培养的细胞。通常采用酶消化法分散细胞，制成单个细胞悬液，备用。

(3) 实体组织可采用机械法、化学法、酶消化法分散组织细胞。通常是联合应用。细胞悬液用 PBS 洗涤，备用。

2) 样品固定

除了分选活细胞或分析活细胞外，都应该固定细胞。

(1) 甲醛法：在细胞悬液中，加入等体积的 8%甲醛-盐水 G，4℃固定 12~18h。常用于 Fuelgen 染色。

(2) 乙醇法：细胞悬液离心，弃上清，用 5ml 4℃预冷的盐水 G 重悬，缓慢加入-20℃的 95%乙醇 15ml，使其终浓度为 70%，冰浴 30min。常用于 Hoechst、溴化乙锭、碘化丙锭(PI)、异硫氰酸荧光素等染色。

(3) 丙酮法：用生理盐水悬浮细胞，加入冷丙酮，使其终浓度为85%。常用于免疫荧光染色。

盐水 G 的配制：葡萄糖 1.1g、NaCl 8g、KCl 0.4g、$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.39g、KH_2PO_4 0.15g，加蒸馏水至 1L。待完全溶解后，称取 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.54g、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.16g，依次溶解于上述 1L 盐溶液中。

3) 细胞染色

这里仅介绍几种常见的染色。

(1) PI 染色。PI 能嵌入双螺旋之间，不能通过完整的细胞膜。在染活细胞时要将细胞固定或打孔，另外，染 DNA 时需要用 RNA 酶处理细胞。激发波长为 488nm。

a. PI 15mg，枸橼酸钠 0.1g，NP-40 0.3ml，加蒸馏水至 100ml，4℃避光保存。

b. 将等体积的单细胞悬液和 PI 染液混合，4℃放置 15~20min。

c. 测量前将样品用 300 目尼龙膜过滤。

(2) 光辉霉素(MI)染色。MI 只与 DNA 以非共价键结合。激发波长为 488nm。

a. MI 染液的配制：商品 MI 每支含 MI 2.5mg，用 15mmol/L $MgCl_2$ 及 150mmol/L NaCl 溶液将 MI 配制成 100μg/ml 溶液，4℃避光保存。

b. 制备单细胞悬液：活细胞悬浮于含有 5%~10%胎牛血清的培养液中；经 70%乙醇固定的死细胞悬浮于生理盐水。细胞密度为 10^5~10^7 个/ml。

c. 将细胞悬液与等体积的 MI 染液混合，室温染 15~20min。

d. 测量前将样品用 300 目尼龙膜过滤。

(3) DNA 和 RNA 双重染色。

a. 制备活细胞悬液，悬浮于培养液或 PBS 中；用蒸馏水溶解 Hoechst33258，用 PBS 稀释成 1mmol/L 的储存液，4℃避光保存。

b. 将 5μmol/L 的 Hoechst33258 染液与等体积细胞悬液混合，37℃，避光 60~90min。

c. 继续加入 5μmol/L 的 PY 染液，37℃静置 45min。

d. 1000*g* 离心 1min，除去染液，用 RPMI1640 培养液悬浮细胞。

e. 用紫外光(351~363nm)激发 Hoechst33258 测定 DNA，用 476nm 波长激发 PY 测定 RNA。

4) 注意事项

(1) 在制备样品时，离心次数不要过多，防止细胞丢失或凝集成块。

(2) 消化细胞时应该注意各种不利因素，注意酶的浓度和活性。

(3) 细胞固定时间不能过长。不要使用冰醋酸-乙醇、苦味酸及含汞固定剂。

(4) 调试 FCM 时，应使用理想的标准品，以便获得较高的分辨率。

6.1.3.4 分离、检测处于不同时相的细胞

6.1.3.4.1 离心淘洗法

1) 原理

有些细胞，处于不同时相时的体积和重量会有明显差别，可以通过密度梯度离心来分离。该方法操作简单、省时，得到的细胞群体均一性较好，成本低，并且不扰乱细胞生长。但是，对于多数种类的细胞并不适用。

2) 操作规程

(1) 细胞培养。

(2) 淘洗前将处于对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化，并重悬于 20ml(5ml 分离室)或 100ml(50ml 分离室)冷的组织培养液中。

(3) 分离所需的最佳细胞数，5ml 分离室为 4×10^7~6×10^7 个细胞，50ml 分离室为 4×10^8~6×10^8 个细胞。

(4) 这里给出分离 CHO 细胞的步骤：

a. 用冰浴冷却的含血清的完全培养基淘洗(血清含量根据细胞类型的不同来决定)。

b. 调转速和流速，使细胞停留在分离室。

c. 借助泵的作用加入样本，不要使标本进入气泡清除室。

d. 加样后即开始收集每一个转速下洗脱出的液体，转速的增加要使各组分洗出细胞的体积稳步增加。

e. 分离过程中，每一流分细胞数、细胞体积均需检测。

f. 对每一流分，从体积分布以校准常数求出中位数体积。校准常数由统一大小和密度的乳胶颗粒推导出。

g. 以体积中位数为基准，选择处于不同时相的细胞以备进一步研究。每一流分的均一性都用流式细胞仪来评估。

3) 注意事项

淘洗系统应在实验前 12~24h 内消毒，以免细菌或酵母污染。

6.1.3.4.2 M 期细胞振荡脱落法

1) 原理

单层生长细胞在 M 期变圆，对瓶壁的锚着减弱，易于游离到悬浮液中。该方法不干扰细胞生长，但是分离的细胞数少且只能用于贴壁生长的细胞。

2) 操作规程

轻轻摇动或在边台上叩击培养瓶。使培养液冲刷瓶壁，然后吸出培养液以收集 M 期细胞。从各培养瓶中收集培养液、集中、离心，使 M 期细胞沉积下来。细胞重悬，用流式细胞仪来评估均一性，供进一步的分析。

6.1.3.4.3 药物诱导同步化——同步化在 G_0/G_1 期

1) 原理

血清撤离可以使细胞停滞在 G_0 期，添加后重新进入细胞周期。

2) 操作规程

(1) 以汇合密度的 30%重悬细胞、培养，血清浓度依细胞种类的不同选定，一般是 0~0.5%。

(2) 血清饥饿 24~48h 后，细胞进入 G_0 期样的状态。

(3) 重悬细胞，用含血清培养基培养，细胞将重新进入细胞周期不同时间取样，用流式细胞仪评估均一性。

3) 注意事项

(1) 首先要搞清楚指数生长期细胞的倍增时间和将可达到的汇合/最大细胞密度。

(2) 血清撤出需要掌握最佳的撤除量及撤除时间。

(3) 有些细胞不适合用血清饥饿法。

6.1.3.4.4 药物诱导同步化——同步化在 G_1 期早期

1) 原理

Lovastatin 抑制 HMG-CoA 还原酶，可使细胞停滞在极早的 G_1 期。

2) 试剂

用 95%乙醇稀释 Lovastatin 到 50mg/ml，溶液中加入 1mol/L 的 NaOH 调高 pH，再用 1mol/L 的 HCl 中和。活化后用无菌去离子水稀释至 10mmol/L，−20℃储存备用。

3) 操作规程

(1) 以最大细胞密度的 30%培养细胞，培养液中加入 Lovastatin。浓度依照细胞种类的不同而调整，一般是 10~60μmol/L。

(2) 用 PBS 洗 2 次以解除 Lovastatin 的作用，然后用含有甲羟戊酸的培养基培养，密度是汇合密度的 30%~40%。甲羟戊酸的浓度应在所用 Lovastatin 浓度的 100 倍以上。

4) 注意事项

很多细胞经 Lovastatin 处理后，在恢复中 G_1 期被延长了。

6.1.3.4.5 药物诱导同步化——同步化在 G_1 期晚期

1) 原理

Mimosine 是从植物中获得的，能将细胞阻滞在 G_1 期晚期。

2) 试剂

Mimosine 用 PBS 溶解，终浓度是 100mmol/L，4℃储存备用。

3) 操作规程

(1) 指数生长期细胞在含 100~400μmol/L Mimosine 的培养液终，培养 16~24h。

(2) 用 PBS 洗 2 次，解除 Mimosine 的阻滞作用，以汇合密度的 30%~40%重悬于培养液中，继续培养。

6.1.3.4.6 药物诱导同步化——同步化在 G_1/S 期交界点

1) 原理

TdR 是 DNA 合成抑制剂，加入 TdR 后一段时间，所有细胞将处于 S 期，但是可能处于 S 期的任何时期。

2) 操作规程

(1) 用 PBS 将 TdR 稀释，过滤除菌，−20℃储存备用。

(2) 将指数生长期细胞用含有 2mmol/L TdR 的新鲜培养液培养($T_{G_2}+T_M+T_{G_1}$)，此时细胞位于 G_1/S 期交界点和 S 期的任何时期。

(3) 用 PBS 洗 2 次，解除 TdR 的抑制作用。用新鲜培养液培养一段时间(要小于 T_{G_1})，使得原来处于 S 期末的细胞没有进入 S 期，原来处于 G_1/S 期交界点的细胞离开 S 期。

(4) 再次进行 TdR 抑制，12~14h。这时所有细胞都处于 G_1/S 期交界点。取样，用流式细胞仪评估细胞周期时相。

(5) 除去二次 TdR 的抑制作用，释放后不同时间取样，可以获得需要的、位于不同时相的细胞，用流式细胞仪评估后，可供进一步检测。

3) 注意事项

这是应用最广泛、也是最被认可的细胞周期同步化技术。第一次的释放时间长短是至关重要的。

6.1.3.4.7 M 期细胞同步化

1) *原理*

用秋水仙素、秋水仙胺或 nocodazole 等，能抑制细胞分裂，将细胞阻断在 M 期。该方法常常与 M 期细胞振荡脱落法联合应用。

2) *注意事项*

(1) 由于该方法常常造成细胞的不可逆变化，所以此方法有一定争议。

(2) 药物浓度、作用时间都需要摸索。

6.2 干细胞分化检测

6.2.1 细胞分化概述

分化(differentiation)是指细胞分裂后逐渐成为与来源细胞在结构和功能上有着稳定差异的细胞的过程。分化的标志是出现奢侈蛋白(luxury protein)。细胞分化的实质是基因表达调控所导致的时空特异性表达。细胞分化被认为是在退出周期时发生的。

6.2.2 干细胞的分化模式

干细胞因为其具有多向分化潜能和自我更新能力，其分化模式曾有不同的观点。目前较为大家接受的是“不对称分化”，即干细胞完成分裂，其中一个子代细胞进入分化(最终成为成熟细胞)，另一个子代细胞仍然维持“干性”(仍然是干细胞)。这样，维持了干细胞数量的稳定，同时解释了大规模的细胞死亡、补充所需要的细胞来源。

6.2.3 决定的发生、细胞分化的鉴定

在能够识别一个细胞的分化之前，就有了一个预先保证细胞怎样变化的时期，这一阶段就被称为决定。关于决定，有两个中心的问题——决定是否可逆？受精卵什么时候获得有限的发育潜能?

(胚胎)移植实验是判断是否已经决定的标准方法。

(秦立蓬)

6.3 干细胞增殖分化调控的研究策略

干细胞的增殖分化是由其自身及所处的微环境共同调控的，它们形成一个复杂而又精细的分子信号网络。对这个网络上的每个点、它们之间的交互作用以及整个网络的研究正不断深入。目前研究最多的还是线性或简单网络状的信号传导，这些信号途径包含一系列的化学反应，使一个来自细胞外部的化学信号在细胞内产生响应。这个过程包括：

(1) 细胞外出现的信号：通常是激素、神经递质或生长因子。

(2) 信号结合到受体上导致受体构造的改变，这样传递信号到细胞内部。

(3) 信号导致许多酶催化蛋白质相互作用，最终导致细胞功能的改变(如细胞周期进程的调控、干细胞分化、细胞分裂和转录等)。

大量蛋白质作为信号途径的一部分被活化。这些蛋白质包括细胞表面受体、蛋白激酶、蛋白磷酸化酶、磷酸酯酶、GTP 水解酶、细胞骨架/微丝蛋白、转录因子以及其他参与动态平衡、代谢、DNA 复制、RNA 转录、翻译和翻译后修饰的蛋白质。另外一些蛋白质将发生表达、定位、活化状态的变化作为它们活化的效应，最终影响从发育模式的确定到细胞增殖和死亡的决定等多种生理过程。随着对机制的了解，对现象的理解将不断加深，也能对干细胞的应用产生很大的推动作用。

在分子机制的研究方面，所利用的策略和技术与普通分子生物学和生物化学是共通的，涉及干细胞的特殊性的只是其作为干细胞特有的生理特征及其利用的特殊分子和信号途径网络。下文将列出常用的一些相关实验策略和方案。

对于分子机制的研究方法多种多样，概括起来可分为两类：一类是从生命现象到功能分子的研究，通过广谱的筛选、确认寻找到与某种特定的生命现象相关的分子；另一类则是已经对某个特定的功能分子背景有所了解，在选定了研究对象后，再去研究其特异的生物学功能。

6.3.1 从生命现象到功能分子的研究

胚胎发育的过程也就是干细胞发生增殖分化的过程，分子水平的研究是将它们拆分成各个细节来进行的。一旦我们发现了某个特定的生命现象，希望探讨是哪些分子在这个现象中发挥作用，在背景不明确的前提下，目前的分子生物学技术已为我们提供了许多大规模筛查的方法。

特殊的生命现象必定对应一系列特异蛋白的表达，寻找到合适的参照物后，在基因水平，可利用的技术有：消减 cDNA 文库的制备、以 PCR 为基础的消减 cDNA 克隆、mRNA 差异显示 PCR、限制性内切核酸酶介导的分化展示、以 AFLP 为基础的转录谱分析、基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)，以及核酸微阵列技术(microarray，又称基因芯片)等。

在蛋白质水平，蛋白质组的方法正逐渐成为探寻信号转导中的分子机制最有效的方法之一。它包括双相聚丙烯酰胺凝胶电泳(two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE)、质谱分析技术、基质辅助激光解吸飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption-time of flight-mass spectrometry, MALDITOF-MS)、蛋白质芯片技术、用于发现和研究在活细胞体内的蛋白质与蛋白质之间相互作用的酵母双杂交技术等。在酵母双杂交技术的基础上又出现了酵母单杂交、酵母三杂交和酵母的反向杂交技术，它们则分别用于核酸和文库蛋白质之间的研究、三种不同蛋白质之间的互作研究和两种蛋白质相互作用的结构和位点的研究。

通过系统生物学的数学模拟，也能从相关现象中推算出有关联的信号分子。与信号传导相关的数据库包括：CSNDB(http://geo.nihs.go.jp/csndb/)是以数据和知识为基础的数

据库，可用于人类细胞的信号转导研究；transpath(http://193.175.244.148)网站，关注多个物种中参与调控转录因子的信号途径，包括人、小鼠和大鼠；SPAD(http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/eny-doc/)是一个整合的数据库，包括基因信息和信号转导系统；用于生物信号途径研究功能最强大、最广泛使用的数据库是 KEGG(http://star.scl.kyoto-u.ac.jp/kegg/)，它包含了代谢信号途径，信号转导途径以及分子组装途径。此外，还有许多与信号转导相关的数据信息，如细胞信号联盟中的数据(http://www.afcs.org/ alliance ofr cell signaling)等。

各种 DNA 文库、肽库的构建也为寻找功能分子提供了一种更为直接的方法，利用干细胞来源的cDNA文库、噬菌体mRNA展示文库可以直接筛选到功能蛋白的编码基因，对细胞进程进行正向和反向分析。

发现了分化表达的相关基因后，对这些特定的基因进行测序，可能获得新基因提交序列库，利用 BLAST 程序寻找相似序列，在网络蛋白质数据库中进行比对获得它们的基础信息，再进行进一步的功能鉴定，最终确定它们所发挥的作用。

6.3.2 从功能分子到生命现象

对某个特定的功能分子展开研究涉及的方法更为多样，根据研究的方向，可大致分为以下几方面。

首先，为研究感兴趣的分子，可以在细胞天然状态下进行，也可以通过外源强制表达或抑制表达来观察该基因相关的生理现象。导入外源基因可通过各种质粒或病毒载体的构建实现，在胚胎干细胞阶段，通过同源重组基因瞄靶既能实现基因的插入，也能实现基因的敲除。另一方面，要实现特定基因的表达沉默，可以采取 RNA 干涉技术，导入小分子 RNA(microRNA，miRNA)也是一种有效的方法。

其次，由于信号传导和细胞周期调控包括配体、受体、细胞内信号途径，以及对转录、染色体结构、DNA 复制、有丝分裂和细胞周期进程的调控。针对不同的层面可采用不同的检测方法。

第一，用免疫沉淀的方法可分离信号传导通路中某个蛋白质随后测定其活性，从而判定信号传导通路的活动。

第二，蛋白质的活化包括磷酸化、乙酰化、特异性剪切、亚硝基化以及其他形式的活化，利用各公司不断开发的各种活化蛋白的特异性抗体，能检测各种不同类型的翻译后修饰的蛋白质[包括磷酸化位点特异性抗体(phosphorylation site-specific antibody, PSSA)，剪切位点特异性抗体(cleavage site-specific antibody, CSSA)等]，这些抗体可用于 Western 印迹检测、免疫组织化学、免疫细胞化学以及流式细胞术的检测。针对蛋白质磷酸化的特殊活性，除利用识别特异磷酸化位点的抗体外，还可以利用外源底物分析蛋白质激酶的酶活性。

第三，在信号调控的过程中，必然存在蛋白质的相互作用，这方面可以利用的技术有：相互作用陷阱/双杂交系统鉴定相互作用的蛋白质、亲和纯化获得结合到 GST 融合蛋白上的蛋白质、克隆以噬菌体为基础相互作用蛋白质的表达、表面胞质共振(surface plasmon resonance)测定生物学相互作用、以共沉淀技术检测蛋白质-蛋白质的相互作用、通过远 Western 分析检测蛋白质的相互作用、双杂交双诱饵系统以及利用相互作用陷阱/

双杂交系统鉴定失去相互作用的突变蛋白等各种先进的技术。

第四，当核酸的结构和功能本身受到信号调控的影响时，可能采取的研究包括：微球菌核酸酶分析染色体的结构，通过 TAU 胶分离同类异型组蛋白的可变形式，染色体免疫沉淀，染色质复合物的 DNase I 和羟基活化状态分析等。为研究 RNA 和蛋白质的相互作用，可采用琼脂糖凝胶分离/纯化 RNA 蛋白质复合物，通过 UV 交联鉴定 RNA 结合蛋白，以及通过 MS2-MBP 纯化功能性 RNA 蛋白质复合物的方法。

最后，随着生物信息学不断介入干细胞研究，改变了常规的以个体为基础的研究方式，而代之以系统的分析方法，通过不断积累的高通量的数据，在细胞水平给出了蛋白质相互作用的图谱，还能同时利用这些数据对信号转导途径作出推测，包括构建信号途径的模型、研究进化关系、理解生物机制(如亚细胞水平的定位预测、结构预测、基因调控域的预测等)，利用这些信息能实现对实验数据的解释和整合，并设计出相关的新实验。

综合以上的研究，我们将有可能实现对干细胞增殖分化调控中某些分子功能的充分了解。

6.3.3 信号转导与增殖、分化、凋亡有密切的关系

干细胞是一类增殖较慢，能自我维持增殖的细胞，具有定向分化的潜能，根据其分化的能力又分为全能、多能和专能干细胞几种。当某些基因永久性地关闭，另一些基因顺序表达时，细胞就具备了某一特定方向分化的能力。干细胞的增殖、分化、凋亡都受到信号分子的调控。

首先，细胞增殖是细胞最基本的生理活动。生长因子、激素及癌基因产物等均可诱导细胞的增殖或抑制细胞的增殖，它们处在信号途径的各个环节，归根到底是影响细胞周期的运行。细胞对增殖刺激作出应答时需要合成新的蛋白质，并发挥这些蛋白质的功能。可见在控制增殖时，基因表达调节系统发挥了重要作用。

分化是指细胞分裂后逐渐成为与来源细胞在结构和功能上有着稳定差异的细胞的过程。分化是细胞内不同基因在不同发育阶段选择性激活的结果，细胞内不同基因在时空上有序表达的结果。细胞分化的基础是细胞核内基因组选择性地表达，而核内基因的活性又受核所在胞质环境的影响，是核质相互作用的结果。微环境对细胞分化也具有重要的决定作用，通过细胞间直接接触进行信息传递，细胞外基质、黏附分子、细胞因子的作用，从基因水平、转录水平、翻译水平调控特异基因的表达从而实现分化调节。

细胞凋亡(apoptosis)，又称程序性死亡(programmed cell death, PCD)是一种由基因调控的主动有序的细胞死亡过程，在个体发育和维持机体平衡中发挥重要作用。在胚胎发育的形态发生阶段和突触生成阶段都有细胞凋亡，在成年动物的组织转换阶段和免疫应答的结束阶段也有细胞凋亡，其生理功能十分重要。细胞凋亡也与细胞内信号转导有关。哺乳动物中有一系列与凋亡相关的基因或基因家族，如 *ced*、*caspases*、*Bcl-2*、*p53* 等。在细胞外则有专门的传感器，即“死亡受体”，它属于肿瘤坏死因子受体基因超家族。这些受体与其配体的结合和其后介导的信号转导通路造成了细胞凋亡，但不同的受体有不同的信号通路响应。

当信号传导发生失调，将出现生长、分化的障碍，细胞生长障碍表现为生长不全或过度增殖，病理上表现为增生和肿瘤细胞的生长失控。细胞分化障碍则是肿瘤细胞的基本特征，其原理包括干细胞发育分化受阻、细胞癌基因的激活、抑癌基因的缺失或失活，通过诱导分化则有可能逆转肿瘤的恶性表型。可见，对细胞生理或病理状态的信号传导的研究具有重要的理论和实践价值。

(谢小燕)

6.4 常规操作

干细胞的研究也需要从分子生物学水平上进行，一些基本的分子生物学实验，如凝胶电泳、载体的构建、转染细胞等，在干细胞实验中也频繁用到。由于生命科学研究的发展，分子生物学研究技术也越来越多，越来越完善，分子生物学实验指南就概括了所有基本的实验操作，各种反应试剂盒的出现使实验操作更加简便，也提高了实验的效率。本节就干细胞实验中用到的常规操作进行简单的描述。

6.4.1 细胞组分的提取

细胞组分的提取主要包括核酸的提取、蛋白质和细胞器的提取(奥斯伯等 2001)。核酸的提取又包括 DNA 的提取和 RNA 的提取。DNA 的提取中常用的是细菌质粒 DNA 的提取和细胞基因组 DNA 的提取。

6.4.1.1 DNA 的提取

6.4.1.1.1 质粒 DNA 的提取

质粒已成为目前最常用的基因克隆的载体分子，重要的条件是可获得大量纯化的质粒 DNA 分子。其基本原理为：当菌体在 NaOH 和 SDS 溶液中裂解时，蛋白质与 DNA 发生变性，当加入中和液后，质粒 DNA 分子能够迅速复性，呈溶解状态，离心时留在上清中，蛋白质与染色体 DNA 不变性而呈絮状，离心时可沉淀下来。

质粒 DNA 的提取可分为小量制备质粒 DNA 和大量制备 DNA。小量制备 DNA 采用 Promega 公司的 Plus SV Minipreps DNA 纯化提取试剂盒，大量制备 DNA 采用碱裂解法以及氯化铯/溴化乙锭平衡离心法，碱裂解法可能是最常用的质粒制备方法，该法不仅相当快捷可靠，而且可获得相当纯净的粗制 DNA，而氯化铯/溴化乙锭平衡离心法则可以得到除去了大多数杂质的高纯度质粒 DNA。但它需要使用溴化乙锭，并且需要长时间的超速离心来形成密度梯度。

1) 小量制备

质粒 DNA 的小量制备主要采取 Promega 公司的 DNA 小量提取试剂盒(Wizard^R Plus SV Minipreps DNA Purification System)。

(1) 材料：含抗生素的 LB 琼脂糖平板、含抗生素的 LB 的培养液、95%乙醇、离心机、1.5ml Ep 管。

(2) 方法(图 6.1)：

a. 从 LB 琼脂糖平板上挑选单克隆菌落，转入 1~10ml LB 培养液中培养。对于高拷贝质粒，建议培养液不要超过 5ml，因为培养液再多，由于试剂盒的微型柱的限制，质粒 DNA 的得率不会再有提高；对于低拷贝质粒，可多加培养液，但不要超过 10ml，因为培养液过多很容易导致细胞裂解液难以有效分离和质粒 DNA 的污染。

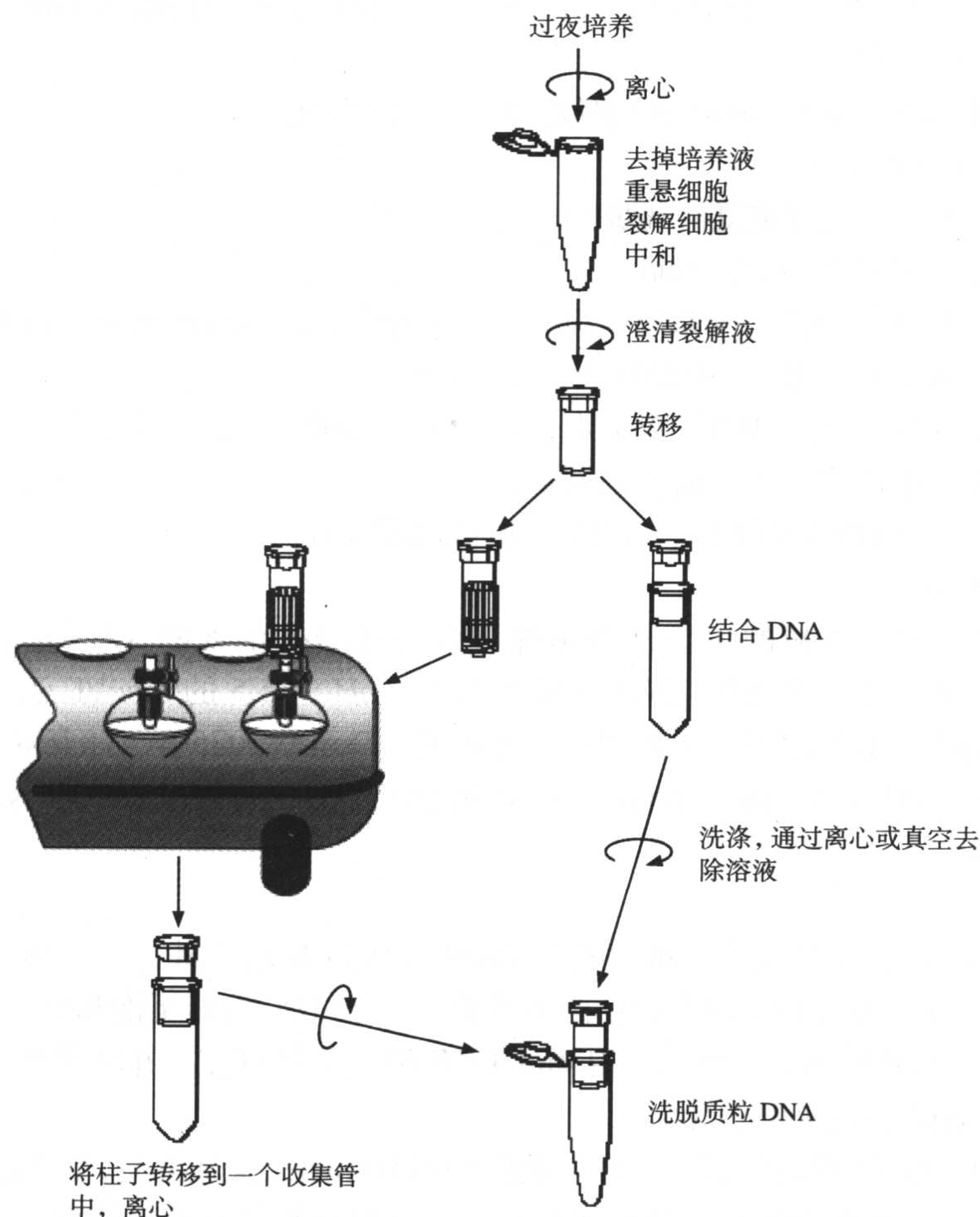


图 6.1　质粒 DNA 小量提取流程图(图片引自 Promega 公司)

b. 将培养管在摇床中 37℃过夜培养，培养时间可以根据培养液容量进行最优化以提高质粒 DNA 的得率，但如果培养时间过长，则会由于细菌营养不良、老化而死亡、裂解导致质粒 DNA 的得率下降。

c. 收集 1~5ml(高拷贝质粒)或 10ml(低拷贝质粒)菌液于 1.5ml Ep 管中，1000*g* 离心 5min，弃上清，将 Ep 管倒置于吸水纸上以除去残存的液体。

d. 加入 250μl 细胞重悬液，剧烈振荡将沉淀重悬，这一步非常重要，一定要完全重悬细胞。

e. 再加入 250μl 细胞裂解液，轻轻颠倒混匀 4 次，静置 1~5min 至细胞悬液变清。

f. 加入 10μl 碱性蛋白酶液，颠倒混匀 4 次，室温静置 5min。

g. 加入 350μl 中和液，然后立即颠倒混匀 4 次。

h. 室温、14 000*g* 离心 10min。

i. 将圆形柱放入 2ml 的收集管中，每个样品一套。

j. 将步骤 h 离心后的上清液移入步骤 i 的圆形柱中，注意不要移入白色沉淀。

k. 室温、14 000*g* 离心 1min，拿开圆形柱，将收集管中的液体倒掉，再将圆形柱放入收集管中。

l. 向圆形柱中加入 750μl 用 95%乙醇稀释的清洗液。

m. 重复步骤 k。

n. 用 250μl 柱洗液重复清洗步骤。

o. 室温、14 000*g* 离心 2min。

p. 将圆形柱转移到一个新的 1.5ml 的 Ep 管中，注意圆形柱不要带有柱洗液，如果有的话就室温下 14 000*g* 再离心 1min。

q. 向圆形柱中加入 100μl 双蒸水，室温下 14 000*g* 离心 1min，以便质粒 DNA 从圆形柱中洗脱。离心后弃去圆形柱。

r. 测定质粒 DNA 的浓度，−20℃或更低温度保存。

2) 大量制备

(1) 材料：带有质粒的大肠杆菌菌株、含有适当抗生素的 LB 培养基、葡萄糖/Tris/EDTA 溶液、卵清溶菌酶、NaOH/SDS 溶液、pH 约 5.5 的 3mol/L 乙酸钾溶液、异丙醇、TE 缓冲液、CsCl、10mg/ml 溴化乙锭溶液、Dowex AG50W-X8 阳离子交换树脂、CsCl/TE 溶液：100g CsCl 溶于 100ml TE 缓冲液中、TE 缓冲液/0.2mol/L NaCl、100%乙醇和 70%乙醇。

(2) 方法：

a. 往 2L 烧瓶中加入 500ml 含有适当抗生素的 LB 培养基，然后加入 5ml 过夜培养的带有所需质粒的大肠杆菌培养物，再于 37℃培养至饱和状态。

b. 4℃、6000*g* 离心 10min，用 4ml GTE 溶液重悬沉淀，并转移到一个容积不小于 20ml 的高速离心管中。

c. 加入 1ml 新配的含 25mg/ml 溶菌酶的 GTE 溶液，重悬沉淀，于室温放置 10min。

d. 加入 10ml 新配的 NaOH/SDS 溶液，并且轻轻混匀直至液体变得均一、清亮而黏稠，于冰上放置 10min。

e. 加入 7.5ml 乙酸钾溶液，用吸管轻轻搅拌直至黏稠度下降并形成大的沉淀，于冰上放置 10min。

f. 4℃、2000*g* 离心 10min，将上清轻轻倒入另一个干净的离心管中，如果有可见的漂浮物可用数层纱布过滤。

g. 加入 0.6 倍体积的异丙醇，颠倒混匀，室温放置 5~10min。

h. 室温、1500*g* 离心 10min。

i. 加入 2ml 70%乙醇轻轻洗涤沉淀，然后短暂快速离心，吸去乙醇，并真空干燥。

j. 将沉淀溶于 4ml TE 缓冲液中，加入 4.4g CsCl，溶解后，再加入 0.4ml 10mg/ml

溴化乙锭

注意：溴化乙锭是一种诱变剂并能造成环境污染，操作时应戴手套，并且妥善处理。

k. 将溶液转入一个 5ml 的 quick-seal 快速封口的超离心管中，酌情往管中加入 CsCl/TE 溶液，封好离心管，20℃、500 000*g* 离心 3.5h 或 20℃、350 000*g* 离心 14h 以上。

l. 首先从管的顶端插入一支 20G 针头，然后用带另一 20G 针头的 3ml 注射器将质粒带吸出

注意：为了防止紫外线对眼睛的严重损伤，应戴紫外防护眼镜或面罩。操作溴化乙锭时要戴手套。

m. 进行第二次超速离心(步骤 k 和 l)，除去混杂的 RNA 和染色体 DNA 以获得更高纯度的质粒。

n. 将质粒 DNA/EB 溶液的 1.5~2 倍体积装 Dowex AG50W-X8 柱子，用数倍体积的 TE/0.2mol/L NaCl 溶液清洗和平衡柱子。

o. 用注射器将混有溴化乙锭的质粒 DNA 溶液直接加到树脂的顶部，注意不要摇动树脂。

p. 立即收集流出液，然后用 2 倍于上样体积的 TE/0.2mol/L NaCl 溶液洗脱柱子 2 次。

q. 加入 2 倍体积 100%乙醇于室温或−20℃沉淀质粒 DNA。4℃、10 000*g* 离心 10min。

r. 沉淀用 70%乙醇洗涤 1 遍，真空干燥，溶解于 TE 缓冲液，并于 4℃保存。

6.4.1.1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取主要采用的是 Promega 公司的基因组 DNA 提取试剂盒(Wizard^R Genomic DNA Purification Kit)。

1) 造血干细胞及血细胞基因组的提取

(1) 材料：50ml 离心管，异丙醇，70%乙醇，37℃和 65℃水浴。

(2) 方法：

a. 向 50ml 离心管中加入 30ml 细胞裂解液。

b. 轻轻摇晃装有血液的管子让血液混匀，然后将样品(10ml)加入含有裂解液的离心管中，颠倒 5~6 次混匀。

c. 室温下静置 10min 以充分裂解细胞，然后室温、2000*g* 离心 10min。

d. 在不触及肉眼可见的白色沉淀的基础上尽可能吸弃上清，尽管这样，还会有大约 1.4ml 的液体残留。

e. 剧烈振荡离心管直至沉淀全部重悬。

f. 向离心管中加入 10ml 核裂解液，吹打溶液 5~6 次以便细胞充分地裂解。溶液这时应该非常黏稠，如果仍有细胞团存在，那么将离心管放入 37℃温箱中直至细胞团溶解。如果放入温箱 1h 后仍有细胞团，那就再加入 3ml 核裂解液，然后再放入温箱中至细胞裂解。

g. 加入 RNase A 至终浓度为 20μg/ml，将离心管颠倒 2~5 次，然后将离心管放入 37℃温箱 15min，然后取出冷却至室温。

h. 加入 3.3ml 蛋白质沉淀液，然后剧烈振荡 10~20s。这时能够看到小的蛋白簇。

i. 室温、2000*g* 离心 10min。

j. 将上清移入一个新的 50ml 离心管中，加入 10ml 室温的异丙醇。

k. 轻轻地混合溶液直至白色的丝状 DNA 形成可见的团块。

l. 室温、2000*g* 离心 1min，这时 DNA 会形成白色的沉淀。

m. 吸弃上清，再加入 10ml 70%乙醇。轻轻地颠倒离心管数次以便清洗 DNA 沉淀以及离心管壁。然后再重复步骤 l。

n. 小心地吸弃乙醇。由于 DNA 沉淀非常松散，在吸弃乙醇时要避免将沉淀吸入移液管中。沉淀空气中干燥 10~15min。

o. 向离心管中加入 800μl DNA 再水化液，在 65℃水浴锅中孵育 1h 或 4℃过夜，让 DNA 再度水化，期间间歇性地轻轻敲打离心管使沉淀溶液充分混合。

p. 2~8℃保存基因组 DNA。

2) 组织培养干细胞以及动物组织中基因组 DNA 的提取

(1) 材料：异丙醇，70%乙醇，蛋白酶 K，胰酶，PBS，小的高速匀浆器，液氮或者研钵和研棒，1.5ml Ep 管，15ml 离心管，37℃、65℃和 95℃水浴。

(2) 方法：

a. 组织培养干细胞

i. 将细胞收集到 Ep 管中，如果是贴壁细胞，先用胰酶消化，然后再收集细胞。

ii. 13 000~16 000*g* 离心 10s 沉淀细胞。

iii. 吸弃上清，管内还有细胞沉淀以及 10~50μl 残存液体。

iv. 加入 200μl PBS 冲洗细胞，重复步骤 ii 并吸弃上清，然后剧烈振荡重悬细胞。

v. 加入 600μl 核裂解液并用吸管吹打裂解细胞，直至没有细胞团的存在。

b. 动物组织

i. 向 15ml 离心管中加入 600μl 核裂解液，将离心管置于冰上。

ii. 向离心管中加入 10~20mg 的新鲜组织或解冻组织，用高速匀浆机进行组织的研磨，裂解液移入 1.5ml Ep 管中。或者，用液氮处理过的研钵在液氮中研磨组织，研磨好后令液氮自然挥发，研磨后的组织移入 1.5ml Ep 管中，再加入 600μl 核裂解液。

iii. 裂解后的溶液在 65℃水浴锅中孵育 15~30min。

c. 向 Ep 管中加入 3μl RNaseA 酶液，颠倒 2~5 次使溶液充分混合。将 Ep 管放入 37℃温箱孵育 15~30min。之后待 Ep 管降至室温后再进行步骤 d。

d. 向 Ep 管中加入 200μl 蛋白质沉淀液并以极高的速度剧烈振荡 Ep 管 20s，冰上放置 5min。

e. 13 000~16 000*g* 离心 4min，Ep 管底有白色的蛋白质沉淀。

f. 小心地将上清移入一个新的 Ep 管中，并加入 600μl 的异丙醇。

g. 轻轻地混合溶液直至白色的丝状 DNA 形成可见的团块。

h. 室温、13 000~16 000*g* 离心 1min，Ep管底形成白色的小的沉淀，小心地吸弃上清。

i. 再向 Ep 管中加入 600μl 70%乙醇，轻轻颠倒 Ep 管数次以清洗 DNA。然后室温

下，13 000~16 000g 离心 1min。

j. 小心地吸弃乙醇。由于 DNA 沉淀非常松散，在吸弃乙醇时要避免将沉淀吸入移液管中。

k. 将 Ep 管倒置在吸水纸上，室温干燥沉淀 10~15min。

l. 向离心管中加入 800μl DNA 再水化液，在 65℃水浴锅中孵育 1h 或 4℃过夜，让 DNA 再度水化，期间间歇性地轻轻敲打离心管使沉淀溶液充分混合。

m. 2~8℃保存基因组 DNA。

3) 酵母基因组 DNA 的提取

(1) 材料：YPD 肉汤培养基、50mmol/L EDTA(pH 8.0)、20mg/ml 裂解酶、异丙醇、70%乙醇、1.5ml Ep 管、37℃和 65℃水浴。

(2) 方法：

a. 从在 YPD 肉汤培养基中培养 20h 的培养液中取 1ml 放入 1.5ml Ep 管中。

b. 室温、13 000~16 000g 离心，吸弃上清。

c. 加入 293μl 50mmol/L EDTA，使沉淀彻底重悬。

d. 加入 7.5μl 20mg/ml 的裂解酶液，轻轻摇晃 Ep 管 4 次使溶液混合。

e. 将样品放入 37℃温箱中孵育 30~60min，让细胞壁彻底消化，然后冷却至室温。

f. 13 000~16 000g 离心 2min，弃上清。

g. 向 Ep 管中加入 300μl 的核裂解液，轻轻颠倒 Ep 管混合。

h. 再加入 100μl 蛋白质沉淀液，高速剧烈振荡 20s。

i. 冰上静置 5min。

j. 13 000~16 000g 离心 3min。

k. 将上清移入一个新的 Ep 管中，并加入 300μl 异丙醇。

l. 轻轻地混合溶液直至白色的丝状 DNA 形成可见的团块。

m. 13 000~16 000g 离心 2min。

n. 小心弃去上清，用吸水纸吸干残余液体，然后向 Ep 管中加入 300μl 70%乙醇，轻轻颠倒 Ep 管，让乙醇清洗 DNA 沉淀。

o. 13 000~16 000g 离心 2min。小心弃去乙醇。

p. 用吸水纸吸去多余液体，空气中干燥沉淀 10~15min。

q. 向 Ep 管中加入 50μl DNA 再水化液。

r. 加入 1.5μl 的 RNase 液以纯化 DNA 样品。剧烈振荡样品 1s，高速离心 5s，收集液体 37℃孵育 15min。

s. 65℃水浴锅中孵育 1h 或 4℃过夜，让 DNA 再度水化，期间间歇性地轻轻敲打离心管使沉淀溶液充分混合。

t. 2~8℃保存基因组 DNA。

6.4.1.2 RNA 的提取

分离纯净、完整的 RNA 分子对于干细胞的分子生物学方面的实验是很重要的，是进行基因表达分析的基础。RNA 可以拷贝成双链 DNA，并克隆，最终获得相应于干细胞的 cDNA 文库。对 RNA 结构和生物合成的分析有助于干细胞基因表达的研究。本节

只简单介绍 Trizol 法提取干细胞总 RNA，参考了 Invitrogen 公司的 Trizol 操作手册。

1) *材料*

口罩，手套，DEPC 水，Ep 管，枪头，DEPC 水高压后配制的 70%乙醇。

2) *方法*

(1) 去离子水配制 DEPC 水。

(2) Ep 管，枪头完全浸泡于 DEPC 水中，过夜后取出高压，烤干后使用。

(3) 浸泡后的 DEPC 水高压后还原成无 RNA 酶的水，4℃保存。

(4) $25cm^2$ 培养瓶内细胞，如果是贴壁细胞，吸弃培养液，加入 1ml Trizol 液吹打细胞至细胞脱落；如果是悬浮细胞，将溶液离心后去上清，加入 1ml Trizol 吹悬沉淀。

(5) 加入 0.2ml 氯仿/ml Trizol，剧烈振荡 15s，室温静置 10min。

(6) 4℃、12 000*g* 离心 15min，离心后溶液分为 3 层，下层为酚/氯仿层，中间为蛋白质层，无色水相的上层是 RNA 层，占溶液总体积的 60%。

(7) 吸取最上层入一新 Ep 管，注意勿将中间层的蛋白质吸出。

(8) 加入 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 液，颠倒混匀，静置 10min。

(9) 4℃、12 000*g* 离心 10min。

(10) 弃上清，加入 1ml 75%乙醇/ml Trizol 液，轻轻混匀勿振荡，用于洗涤 RNA 沉淀。

(11) 4℃、7500*g* 离心 5min。

(12) 弃上清，小心吸去 Ep 管壁的乙醇，室温干燥。

(13) 加入步骤(3)中的 DEPC 水 30~40μl 溶解沉淀。

(14) 步骤(13)得到的溶液用核酸分析仪检测浓度以及纯度。

(15) −20℃或更低温度保存提取的 RNA 溶液。

6.4.1.3 蛋白质和细胞器的提取

1) *原理*

蛋白质的制备工作涉及物理、化学和生物等各方面知识，但基本原理有两方面：①用混合物中几个组分分配率的差别，把它们分配到可用机械方法分离的两个或几个物相中，如盐析、有机溶剂提取、层析和结晶等；②将混合物置于单一物相中，通过物理力场的作用使各组分分配于不同区域而达到分离目的，如电泳、超速离心、超滤等。在所有这些方法的应用中必须注意保存生物大分子的完整性，防止酸、碱、高温，剧烈机械作用而导致所提物质生物活性的丧失。

蛋白质的制备一般分为以下三个阶段：细胞的破碎及细胞器的分离，提取和纯化，浓缩、干燥和保存。

2) *材料*

① 超声波；② 0.02~0.05mol/L 磷酸盐和碳酸盐；③ 凝胶过滤层析柱及相应的介质和缓冲液；④ 装柱配套用具或凝胶贮槽；⑤ 缓冲液槽；⑥ 蠕动泵；⑦ UV 紫外检测器；⑧ 分部收集器；⑨ Diaflo 超滤膜。

3) *方法*

(1) 细胞的破碎及细胞器的分离：将细胞在−20℃以下冰冻，室温融解，反复几次，

由于细胞内冰粒形成和剩余细胞液的盐浓度增高引起溶胀，使细胞结构破碎，差速离心弃去部分杂质。

(2) 蛋白质的粗提：向溶液中加入磷酸盐和碳酸盐(磷酸铵和碳酸铵)，随着盐浓度的升高，蛋白质从溶液中析出，收集沉淀。

(3) 在盐析蛋白质的同时准备凝胶过滤层析柱，如果凝胶过滤的介质是干粉，则需在凝胶过滤缓冲液中完全溶胀。切勿用磁力搅拌器搅拌，让凝胶颗粒自然沉降，吸去或倾去不沉降的细小颗粒，或者根据厂商的使用指南进行处理。对预溶胀的凝胶，在布氏漏斗或玻璃烧结漏斗中用大量缓冲液洗去防腐剂。重悬于等体积的凝胶过滤缓冲液，倾入细颈过滤瓶中，使用前进行脱气。

在远离过往通道及直接光照的恒温环境，将层析柱垂直安装在稳固的实验室支架上。用一注射器将凝胶过滤缓冲液从柱子的输出管注入柱子，至缓冲液达到柱子支持体平面之上；注射器留在输出端以堵住柱子。

沿着一根顺柱子内壁而放的玻璃棒将凝胶混悬物倒入柱子至所设高度，再小心往凝胶顶部加入 1cm 高的一层缓冲液，并连接缓冲液储存容器，取去堵着柱子输出管的注射器，用 2~3 倍柱床体积的缓冲液洗柱子。

(4) 流尽柱子凝胶顶部上面的缓冲液，关闭其输出管。加入相当于柱床体积 1%~5% 的蛋白质样品。开放输出管，让样品流进柱床，凝胶上面的柱子内壁以缓冲液冲洗，然后在凝胶顶上用吸管加入 1cm 高的缓冲液层，重新与缓冲液储存容器连接，开始洗脱。

(5) 分部收集流出液。每分部相当于 1%总柱床体积，分别测每分部的 A_{280}，并各取小份样品测生物活性。选出有活性的分部用 SDS-PAGE 检测所含蛋白质的数量和质量。合并所需蛋白质的部分。

(6) 用 2~3 个柱床体积的凝胶过滤缓冲液洗柱，柱子保存在含 0.02%叠氮化钠的缓冲液中，柱子可无限次使用。

(7) 步骤(5)所得蛋白质相对较稀，将溶液放入 Diaflo 超滤膜中进行浓缩。

(8) 紫外分光光度计测蛋白质的浓度，溶液 4℃保存。

6.4.2 核酸杂交

核酸分子杂交分子单链之间的互补碱基通过非共价键(主要是氢键)的形成即出现稳定的双链区。分子杂交可在 DNA 与 DNA、RNA 与 RNA 或 RNA 与 DNA 的两条单链之间进行(奥斯伯等 2001)。核酸分子杂交按作用环境分为固相杂交和液相杂交。固相杂交是将参加反应的一条核酸链先固定在固体支持物上，另一条游离在溶液中。固体支持物有硝酸纤维素滤膜、尼龙膜、乳胶颗粒、磁珠和微孔板等。固相杂交时，未杂交的游离片段可容易地漂洗除去，膜上的杂交物有容易检测和能防止靶 DNA 自我复性等优点，故该法最为常用。常用的固相杂交的类型有菌落原位杂交、斑点杂交、狭缝杂交、Southern 印迹、Northern 印迹、组织原位杂交和夹心杂交等。液相杂交所参加反应的两条核酸链都游离在溶液中。

6.4.2.1 DNA 与 DNA 的 Southern 杂交

1) 材料

①0.25mol/L HCl；②变性液(1.5mol/L NaCl/0.5mol/L NaOH，室温保存)；③中和液(1.5mol/L NaCl/0.5mol/L Tris · Cl，pH7.0，室温保存)；④比活性大于 1×10^8dpm/μg 的标记 DNA 探针；⑤水性预杂交/杂交(APH)液(室温及 68℃)；⑥20×SSC(17.5g NaCl, 8.82g 柠檬酸钠，调节 pH7.0~7.4，加水定容至100ml)；⑦2×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS；⑧0.2×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS(室温及 42℃)；⑨0.1×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS(68℃)；⑩ 2×、6×及 20×SSC；⑪ 硝酸纤维素膜；⑫ 68℃水浴锅或温箱；⑬ 杂交管或可封口的杂交袋及加热封口机。

2) 方法

(1) 用适当的限制性内切核酸酶消化 DNA，与合适的 DNA 分子质量标准一起进行琼脂糖凝胶电泳。用溴化乙锭染色，在凝胶的侧沿放一把直尺进行测量，便于以后识别电泳带在膜上的位置。

注意：①在分辨电泳带所需的浓度内，凝胶中琼脂糖的浓度应尽量的小，并且厚度应≤7mm；②从步骤(2)开始应戴手套，以防手受酸碱溶液的损伤，以及避免污染滤膜。取拿滤膜时使用平头镊子。

(2) 按如下方法处理凝胶，室温下轻轻摇动。要确保凝胶被完全覆盖。

蒸馏水：约 10 倍于凝胶体积的 0.25mol/L HCl，30min。

蒸馏水：约 10 倍于凝胶体积的变性液，20min、2 次。

蒸馏水：约 10 倍于凝胶体积的中和液，20min、2 次。

(3) 如图 6.2 所示安装转移叠层系统，其各层组成依次为：海绵或固体支持物，置于一个盛有足以浸没海绵一半高度的 20×SSC 的平皿中，1 张 Whatman 3MM 滤纸桥，3 张 Whatman 3MM 滤纸，凝胶，包裹于凝胶边缘的塑料薄膜，1 张在蒸馏水中浸湿然后又在 20×SSC 中平衡 10min 的硝酸纤维素膜，5 张 Whatman 3MM 滤纸以及一叠 4cm 纸巾塔。每加一层均将其用 20×SSC 浸湿，并用一根 10ml 玻璃吸管在其表面小心滚动以除去所有气泡。

注意：①初次使用海绵前，应用蒸馏水彻底洗净以除去可能存在的任何去污剂；②转移大量的质粒或其他复杂度非常低的 DNA 时，将膜一次就准确放置好十分重要。

(4) 将一块玻璃平板放于叠层上面，其上加一 0.2~0.4kg 的重物以使各层固定，放置过夜。

(5) 取出杂交膜，用铅笔在膜上标记样品孔的位置，并切去一角以标识方向。

(6) 用 2×SSC 漂洗杂交膜，然后将其放在一张 Whatman 3MM 滤纸上，使其完全干燥。

(7) 将硝酸纤维素膜夹于 2 张 Whatman 3MM 滤纸之间，放在真空箱中 80℃干烤 2h。

(8) 用 6×SSC 润湿带有固定了 DNA 的膜。

(9) 将膜的 DNA 面朝上置于杂交管中，APH 溶液的加入量约为 1ml/cm^{2}膜，在 68℃水浴锅中处理 3h。

(10) 在预杂交即将结束时，于 100℃将 DNA 探针变性 10min，置于冰上。

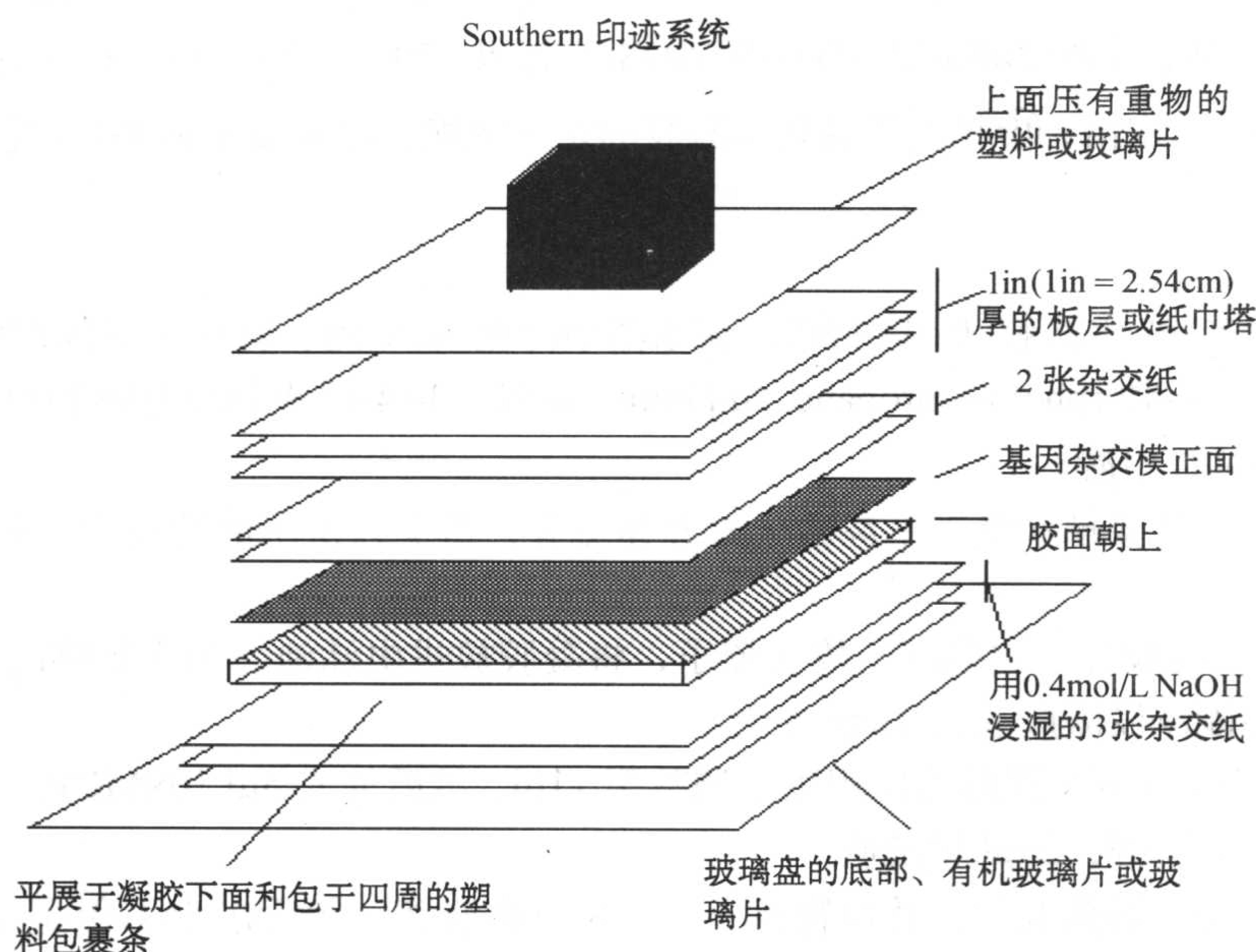


图 6.2　安装转移叠层系统(图片引自 southern blot analysis to charaterize transformants.htm)

(11) 倒掉杂交管中 APH 溶液，换上预热(68℃)的 APH 溶液，加入变性探针，68℃滚动下杂交过夜。

(12) 倒掉 APH 液，加入等体积的 2×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS，室温下滚动孵育 10min，5min 后更换洗膜液。

(13) 倒掉 2×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS，换上等体积的 0.2×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS，重复步骤(12)。

(14) 必要时，在 42℃用 0.2×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS 进行 15min 的中等严谨度的洗膜 2 次。

(15) 必要时，在 68℃用 0.1×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS(68℃)进行 15min 的高度严谨度的洗膜 2 次。

(16) 倒掉洗膜液，室温下 2×SSC 漂洗膜，吸干多余液体，用塑料膜包裹后放射自显影。

6.4.2.2　RNA 的 Northern 杂交

1) 材料

① 二乙基焦磷酸(DEPC)；② 10×和 1×MOPS 电泳缓冲液；③ 12.3mol/L(37%，pH>4.0)甲醛；④ RNA 样品[细胞总 RNA 或带 poly(A)$^+$尾的 RNA]；⑤ 甲酰胺；⑥ 甲醛加样缓冲液；⑦ 0.5mol/L 乙酸铵和溶于 0.5mol/L 乙酸铵的终浓度为 0.5μg/ml 的溴化乙锭；⑧ 含有和不含终浓度 10μg/ml 吖啶橙的 10mmol/L 磷酸钠(pH7.0)/1.1mol/L 甲醛；⑨ 0.05mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl；⑩ 0.5mol/L Tris · Cl(pH 7.4)/1.5mol/L NaCl、(2×、6×及 20×)SSC；⑪ 20×SSC(17.5g NaCl，8.82g 柠檬酸钠，调节 pH7.0~7.4，加水定容至 100ml)；⑫ 溶于 0.3mol/L pH5.2 的乙酸钠缓冲液中的终浓度为 0.03%(*m*/*V*)的亚甲蓝；⑬ 适于做探针

或适于通过体外转录制备 RNA 探针的 DNA；⑭甲酰胺预杂交液和杂交液；⑮2×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS；⑯0.2×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS(室温及42℃)；⑰0.1×SSC /0.1%(*m*/*V*)SDS(68℃)；⑱60℃水浴；⑲稍大于待转印凝胶的矩形海绵；⑳Whatman 3MM 滤纸片；㉑硝酸纤维素膜。

2) 方法

(1) 用 72ml 水溶解 1g 琼脂糖，在水浴中冷至 60℃时，转移至通风橱中加入 10ml 10×MOPS[3-(4-Morpholino)propane sulphonic acid，3-(4-吗啉)硫酸丙烷]电泳缓冲液和 18ml 12.3mol/L 甲醛。

注意：皮肤接触和吸入甲醛蒸气对身体有害，所有涉及甲醛的操作必须在通风橱中进行。

(2) 铺制凝胶并使之凝固，拔去梳子，将凝胶放进电泳池，加入足够的 1×MOPS 电泳缓冲液使能淹没凝胶表面 1mm 左右。

(3) 将每份 RNA 样品的体积用水调整至 11μl，然后加入 5μl 10×MOPS 电泳缓冲液，9μl 12.3mol/L 甲醛，25μl 甲酰胺。

在混合器中振荡混匀，并短暂离心 5~10s 回收液滴，然后在 55℃保温 15min。

(4) 加入 10μl 甲醛加样缓冲液，在混合器中振荡，并短暂离心以回收液滴，每份样品在一对加样孔中分别加入 0.5~10μg RNA 样品，以便可取半片凝胶进行染色显迹。在 5V/cm 电压下电泳至溴酚蓝染料泳动了凝胶长度的一半或 2/3。

(5) 用溴化乙锭染色：取出凝胶，切下需要染色的泳道。放置于无 RNase 的玻璃平皿，加入足够量的 0.5mol/L 乙酸铵覆盖，浸泡 20min。换液再泡 20min 以除去甲醛，倾去液体，加入含 0.5μl/ml 溴化乙锭的 0.5mol/L 乙酸铵，染色 40min，必要时以 0.5mol/L 乙酸铵脱色 1h。

(6) 在紫外透照仪中使凝胶中的 RNA 显迹，沿凝胶的边缘放一把尺子，以便随后能确定膜中的条带。

(7) 将非染色的部分凝胶放置于无 RNase 的玻璃平皿中，加入足够的去离子水浸洗几次以除去甲醛。

(8) 凝胶浸泡在 10 倍体积的 0.05mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl 中 30min，使 RNA 部分水解。接着浸泡于 10 倍体积的 0.5mol/L Tris · Cl(pH7.4)/1.5mol/L NaCl 缓冲液中中和 30min。

(9) 将溶液换成 10 倍体积的 20×SSC，浸泡 45min。

(10) 在一玻璃或塑料平皿中放置一比凝胶略大的矩形海绵，加入足够的 20×SSC 以使海绵半淹没在液体中。

(11) 剪 3 张与海绵同样大小的 Whatman 3MM 滤纸，放在海绵表面，并以 20×SSC 润湿。把凝胶置于滤纸表面，用玻璃吸管在其表面滚动以压挤去除气泡。切 4 条塑料保鲜膜覆盖在凝胶的边缘。

(12) 剪一片与凝胶暴露面积大小相当的硝酸纤维素膜，在一个无 RNase 的玻璃平皿中加入约 0.5mm 深的去离子水，将膜漂在水面使之润湿，直至膜沉没在水中。然后在 20×SSC 中再浸泡 10min。

(13) 将润湿了的膜放在凝胶表面，排去气泡，以 20×SSC 流洗膜表面。切 5 张与膜大小相当的 Whatman 3MM 滤纸，放于膜的表面，然后将切得与膜大小相当的纸巾整齐地堆放在滤纸的表面，高约 4cm。

(14) 在纸堆的顶部放一块玻璃平板，压一重物，放置过夜。

(15) 拆卸转移用的滤纸、海绵等，回收膜和压扁了的凝胶。在膜上用铅笔标上加样孔的位置和方向。

(16) 用 2×SSC 洗膜，然后放在一张 Whatman 3MM 滤纸上，让膜完全干燥。

(17) 将膜夹在 2 张 Whatman 3MM 滤纸中间，80℃真空烤膜 2h。

(18) 如果需要的话，凝胶可按步骤(5)，用溴化乙锭染色以检查转印效率。

(19) 制备放射比活在 10^8dpm/μg 以上的寡核苷酸探针，并除去未标记的寡核苷酸。

(20) 用 6×SSC 液润湿携带 RNA 的膜。

(21) 将膜带 RNA 的面朝上，放入杂交管中，每 10cm^2 膜面积加入 1ml 甲酰胺预杂交液/杂交液，旋转保温 3h，温度设定在 42℃(DNA 探针)或 60℃(RNA 探针)。

(22) 如果是双链探针的话，需在水浴或加热器中加热至 100℃，保温 10min，置于冰上。

(23) 吸所需要体积的探针加入杂交管中，42℃(DNA 探针)或 60℃(RNA 探针)过夜。

(24) 倒出杂交液，按以下程序依次洗膜：

2×SSC/0.1%SDS 室温旋转洗涤 5min×2 次；

0.2×SSC/0.1%SDS 室温旋转洗涤 5min×2 次(低严谨度洗涤)；

在 42℃用 0.2×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS 洗涤 15min×2 次(中严谨度洗涤，可选)；

在 68℃用 0.1×SSC/0.1%(*m*/*V*)SDS 洗涤 15min×2 次(高严谨度洗涤，可选)。

(25) 在室温以 2×SSC 洗膜，吸干多余液体，盖上可透过紫外线的塑料保鲜膜，进行放射自显影。

6.4.3 逆转录

1) *原理*

逆转录技术就是利用逆转录酶的活性，以 RNA 为模板合成 cDNA 的技术，一般情况下提取的 RNA 经过逆转录后紧接着就进行 PCR 反应，所以逆转录、PCR 技术的组合就是 RT-PCR 技术。

2) *材料*

模板 RNA、5×AMV buffer、2.5mmol/L dNTP、RNase 抑制剂(40U/μl)、200μg/ml oligo dT、AMV RTNase(5U/μl)、DEPC 处理水、PCR 管和 PCR 仪。

3) *方法*

(1) 取 PCR 管加入 0.5μl 模板 RNA、1μl oligo dT、5μl DEPC 处理水。

(2) 将 PCR 管 70℃水浴 10min。

(3) 取出冰浴 2min。

(4) 再向 PCR 管中加入 4μl 5×AMV 缓冲液、8μl dNTP、0.5μl RNase 抑制剂、1μl AMV RTNase，离心混匀。

(5) 42℃水浴或放入 PCR 仪中 42℃、1h。

(6) 取出后冰浴 2min。

(7) -20℃保存。

6.4.4 PCR

1) *原理*

聚合酶链反应(PCR)是体外酶促合成 DNA 片段的一种方法，主要依据 DNA 聚合酶能以单链 DNA 为模板，在引物存在时可合成一个与其互补的新链。一个典型的 PCR 反应通常由高温变性、低温退火及适温延伸等几个基本步骤组成。首先使待扩增 DNA 于高温下解链为单链模板，然后降低反应温度使人工合成的两条寡核苷酸引物分别与目的片段两侧序列互补结合，最后 DNA 聚合酶在 72℃将单核苷酸从引物 3′端开始掺入，沿模板链从 5′→3′方向延伸，合成新的 DNA 链。由于每一周期所合成的 DNA 均可成为下一个循环扩增的模板，所以在理论上 PCR 扩增产物呈指数式增加。但当扩增产物拷贝数达到 10^{12} 以后(一般经 25~30 个循环)，扩增效率将明显降低，进入平台期，继续反应将会导致非特异性扩增产物的出现，增加突变的概率。

目前常用的 PCR 技术有逆转录 PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)、巢式 PCR(nested PCR)、反向 PCR(reverse PCR)、cDNA 末端的快速扩增(random amplified of cDNA end, RACE)、武断引物 PCR(arbitrarily primed PCR, AP-PCR)、差异显示 PCR(differential display PCR，DD-PCR；mRNA differential display)。对于细胞的分子水平研究中常用的是 RT-PCR、巢式 PCR、DD-PCR 技术，RT-PCR 是逆转录技术和 PCR 技术的结合，所以这里将介绍基本的 PCR 技术。

2) *材料*

10×buffer；dNTP；正向引物；反向引物；模板 DNA；反应酶[rTaq(5U/μl)、Tli、Pfu 等]；去离子水；PCR 管；PCR 仪。

3) *方法*

(1) 向 PCR 管中加入以下反应物：

10×buffer	10μl
15μmol/L 正向引物	1μl
15μmol/L 反向引物	1μl
模板 DNA	1μl
2.5mmol/L dNTP	5μl
rTaq	1μl

去离子水(补足反应体系至 100μl)。

注意：PCR 常用的反应体系还有 20μl 和 50μl，请根据实验需要进行选择。

(2) 将样品放入 PCR 仪中，加热到 95℃，再向 PCR 管中加入 0.5~1μl 的反应酶。此外还可向管中加入一滴石蜡油防止管内液体的挥发。

(3) 开始 PCR 循环：94℃变性，30~90s；55℃复性(复性温度视引物 T_m 适当调整)，0.5~2min；72℃延伸，1min (DNA 延伸时间可根据 PCR 产物片段长度和进行 PCR 反应

所用的酶而定)。重复以上循环29~32次。

(4) 最后延伸5min，以便完成那些未完成的多聚化。

(5) 降温到4℃保存。

6.4.5 WESTERN

1) *材料*

①半干转膜器 Biorad；②膜(切至凝胶般大小)；③Whatman 3MM 滤纸(切至凝胶般大小)；④100%甲醇；⑤阳极 buffer I(300mmol/L Tris，20%甲醇，pH10.4)；⑥阳极 buffer II(25mmol/L Tris，20%甲醇，pH10.4)；⑦阴极(25mmol/L Tris，20%甲醇，40mmol/L 6-aminohexanoic acid)；⑧洗液(TTBS，50mmol/L Tris，0.5mol/L NaCl，0.05% Tween 20，pH7.4)；⑨封闭 buffer[3% BSA TTBS，0.2%叠氮化钠，pH7.4]；⑩稀释 buffer[1% BSA TTBS，0.2%叠氮化钠，pH7.4]；⑪底物 buffer(0.1mol/L Tris，0.1mol/L NaCl，5mmol/L $MgCl_2$,pH9.5)；⑫NBT 原液(50mg/ml NBT 于 70% DMF 中)；⑬BCIP 原液(50mg/ml BCIP 于 100% DMF)；⑭镊子；⑮手套；⑯刀片。

2) *方法*

参考 R&D 公司的操作手册。

(1) 用合适的 SDS-PAGE 凝胶分离纯化、非纯化的样品和对照。通常情况下，12%的丙烯酰胺凝胶用于分离高分子质量的蛋白质(>50kDa)，15%凝胶用于分离中间分子质量的蛋白质(15~50kDa)，20%凝胶用于分离低分子质量蛋白质(<15kDa)。

(2) 用刀片将加样孔一端的浓缩胶和部分分离胶切掉，并割去胶的右下角以便于指示。

注意：如果条带弥散，在阴极 buffer 中平衡分离胶尽管并非必需，却对结果的改善有益。

(3) 将要转的膜浸泡在100%甲醇中数秒，然后在阳极 buffer II 平衡 5min。

(4) 将两张滤纸用阳极 buffer I 浸湿并铺于阳极一端，要注意避免在铺滤纸时在滤纸和电极之间产生气泡。

(5) 将一张滤纸用阳极 buffer II 浸湿并铺于步骤(4)所铺的滤纸之上。

(6) 将膜从阳极 buffer II 中移到步骤(5)所铺的滤纸上。

(7) 将凝胶铺于膜上，注意在铺的过程中务必不要产生气泡。

(8) 用阴极 buffer 浸湿 3 张滤纸，铺于凝胶之上，用干净的玻璃管轻轻在滤纸上滚动，赶出所有的气泡。

(9) 将阴极电极放于转膜装置的上方，具体情况见图6.3。

(10) 接通电源，一般情况下每平方厘米凝胶有 1.9~2.5mA 的电流。转膜时间是30~60min，根据要转蛋白质的情况而定。

(11) 转膜结束后，关掉电源，移走电极，取下膜并割去右下角给膜定向。

(12) 用封闭液封闭膜上的蛋白质，在摇床上孵育1~2h。

(13) 倒去封闭液，加入20ml的一抗，室温下摇床孵育2~3h。

(14) 倒去一抗，用 TTBS 洗膜 5min，如此重复 2 次。

(15) 加入 20ml 稀释好的二抗，室温下摇床孵育 1h。二抗的稀释比是 1∶8000~1∶50 000。

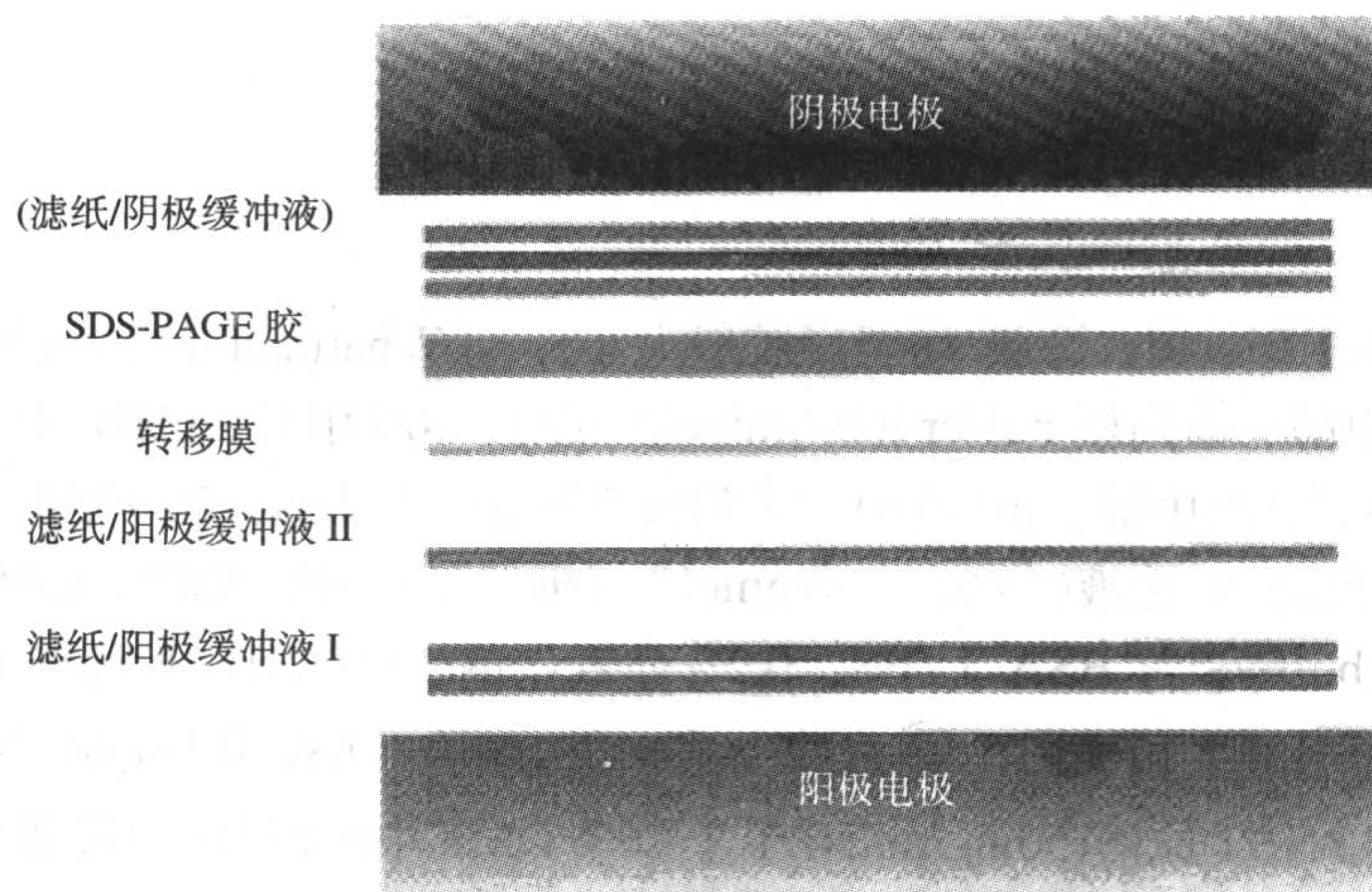


图 6.3 Western 转膜叠层系统(图片引自 R&D 公司)

(16) TTBS 洗膜 5min。

(17) 准备底物孵育液(20ml 碱性磷酸酶液中加入 132μl NBT 原液和 66μl BCIP 原液)，注意不要让膜干燥了。

(18) 加入底物孵育液，在摇床上孵育 10~20min，时间视染色程度而定。

(19) 倒去孵育液，将膜放入去离子水中。

(20) 放射自显影，观察结果。

6.4.6 ELISA

1) 原理

酶联免疫吸附反应(ELISA)的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，受检标本(测定其中的抗体或抗原)与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高，间接地放大了免疫反应的结果，使测定方法达到很高的敏感度。

常用 ELISA 方法有：双抗体夹心法测抗原、双抗原夹心法测抗体、间接法测抗体、竞争法测抗体、竞争法测抗原、捕获包被法测抗体、ABS-ELISA 法。

2) 材料

①PBS(pH 7.3)；②包被液[0.1mol/L Na_2CO_3 (pH9.6)以及 0.02%叠氮化钠]；③洗脱液

[0.9% NaCl-0.05% Tween 20(NaCl/T)]；④PBS-TA[PBS-Tween 20(0.05%)-叠氮化钠(0.02%) pH7.3]；⑤AP(碱性磷酸酶)缓冲液[0.05mol/L Na_2CO_3-0.001mol/L $MgCl_2$ (pH9.3)]；⑥HRP(辣根过氧化物酶)底物[混合等量的四甲基联苯胺(TMB)底物以及 TMB 过氧化物酶溶液]。

注意：①叠氮化钠不能用来反映 HRP 的变化；②洗脱循环步骤对于清除背景干扰非常重要。

3) 方法

(1) 将含有抗原(5~20μg/ml)的包被液加入到塑料管或微型皿中(目前常用的是 Linbro 微孔板或 Costar serocluster "U" 聚乙烯微孔板)。37℃孵育 4h，4℃保存(可保存 2 周)。如果是聚乙烯微孔板，用洗脱液洗 3 次，然后吸水纸吸干多余的液体，封闭好−70℃保存，一般情况下聚乙烯微孔板可保存 6 个月。

(2) 酶标抗体的准备：

a. 8000*g* 离心 0.3ml 碱性磷酸酶(AP，Sigma type VII，1140 U/ml)2min。

b. 沉淀中加入 0.1ml 亲和纯化的特异性抗体(动物特异性，细菌特异性)，这样酶和抗体的比例是 3∶1。

c. PBS 透析过夜。

d. 加入 10μl 的戊二醛(glutaraldehyde)让溶液终浓度为 0.2%。

e. 室温下孵育 2h，稀释到 1ml，然后 PBS 透析过夜。

f. 用 0.05mol/L Tris-5% BSA-1mmol/L $MgCl_2$-0.02% NaN_3 稀释到 10ml。

g. 4℃保存。

(3) 试管和平皿用洗脱液洗 3 次，每次间隔 10min，清洗过程中要确保每个孔都充满了洗脱液。

(4) 用 0.5%BSA 完全填满试管和平皿 1h 以封闭试管和平皿。

(5) 再用洗脱液清洗 4 次，静置 10~15min。

(6) 每个孔里加入 100μl PBS-TA 稀释的抗血清，室温静置 5h 或者冰箱中过夜。通常情况下，1∶100 的稀释比例就足够了，如果是单克隆抗体就不要稀释。

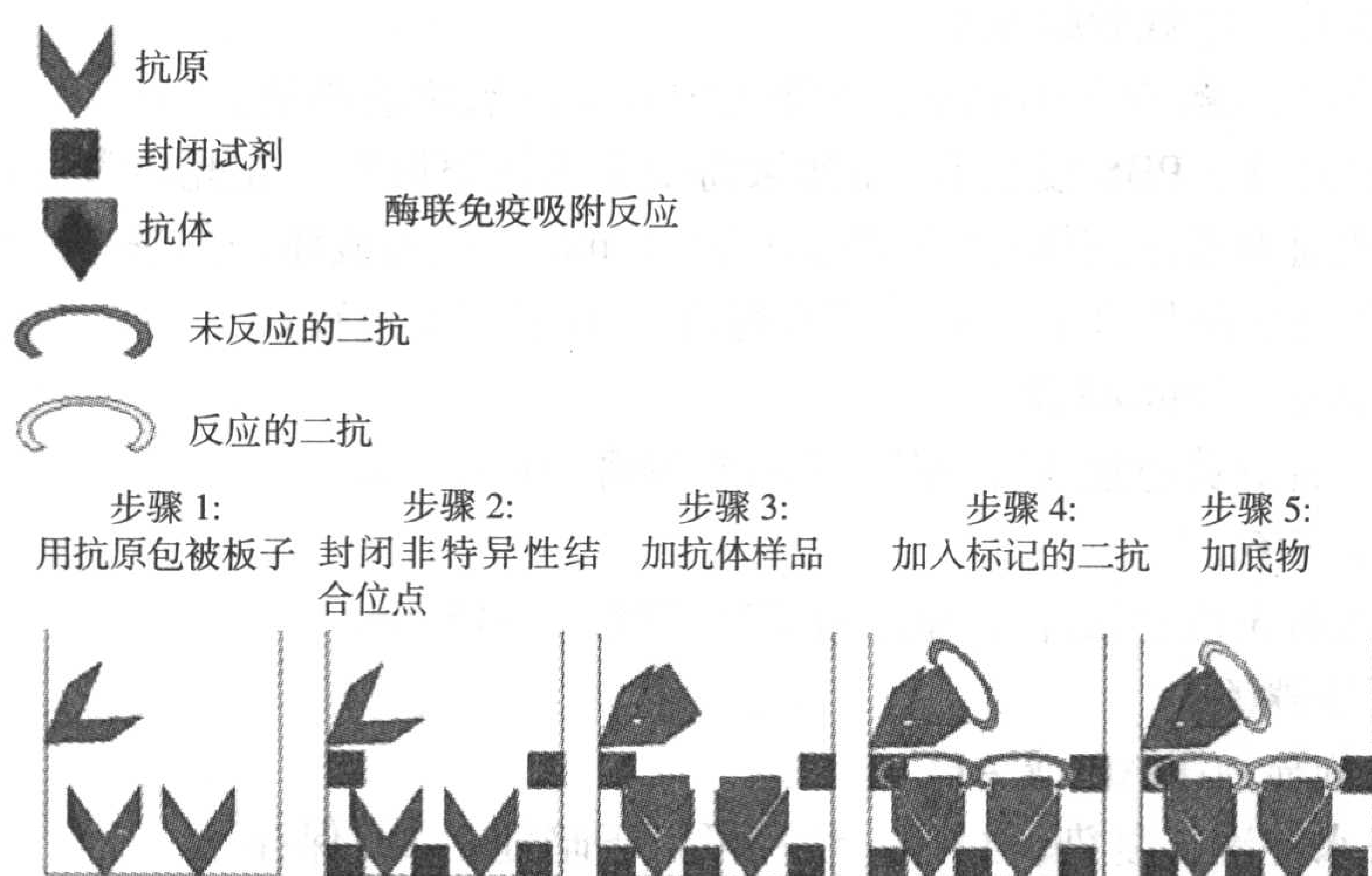


图 6.4 ELISA 反应流程简图(图片引自 IACF-Monoclonal Antibody Facility-Basic ELISA Protocol.htm)

(7) 重复步骤(4)，然后加入 PBS-TA 稀释的酶标抗体，如果是 AP 标记抗体，室温下孵育 4h，如果是 HRP 标记抗体，室温下 1.5h 或 37℃、1h。稀释比例一般是 1∶1000。

(8) 重复步骤(4)，然后每孔加入 100μl 底物。对于 AP 酶标抗体：底物溶液是溶于缓冲液的终浓度 1mg/ml 的硝基磷酸(p-nitrophenyl phosphate)，显色 100min 后用 10μl 1mol/L NaOH 终止反应，405nm 波长测吸光度。对于 HRP 酶标抗体，则应向孔中加入等份的 TMB，待达到既定强度后用 100μl 1mol/L 磷酸溶液终止反应，450nm 波长下测吸光度。

ELISA 反应流程简图如图 6.4 所示。

6.4.7 免疫组化

1) 原理

免疫组织化学是基于利用放射性核素和其他标记物(萤光素、酶、重金属离子等)作为示踪剂，通过免疫亲和(抗原-抗体特异性结合)和核酸杂交(碱基配对特异性连接)途径，在组织切片或细胞涂片上，原位显示生物大分子的动态变化而建立的一门染色技术。

2) 材料

① 过氧化物酶标记的链霉素卵白素染色(sp 系列)试剂盒；② 试剂 1[封闭用正常血清，工作液 3ml、6ml、15ml(蓝色液体)]；③ 试剂 2[生物素化二抗工作液(IgG/Bio)3ml、6ml、15ml(黄色液体)]；④ Sp-9000：通用型生物素标记羊抗兔、大鼠、小鼠和豚鼠 IgG；⑤ Sp-9001：生物素标记羊抗兔 IgG；⑥ Sp-9002：生物素标记羊抗小鼠 IgG；⑦ 试剂 3[辣根酶标记链霉素卵白素工作液(S-A/HRP)3ml、6ml、15ml(橙色液体)]、荧光显微镜。

3) 方法

采用北京中杉公司免疫组化试剂盒(Histostain^{TM}-Plus Kits)操作步骤。

(1) 石蜡切片，常规脱蜡至水。

(2) 3%过氧化氢孵育 5~10min，以除去内源性过氧化物酶的活性。

(3) 蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5min(如果需要采用抗原修复，在此步骤之后进行)。

(4) 滴加试剂 1(蓝色液体)，室温孵育 10~15min，倒去液体，勿洗。

(5) 滴加适当比例稀释的一抗，37℃孵育 1~2h 或 4℃过夜。

(6) PBS 冲洗，5min×3 次。

(7) 滴加试剂 2(黄色液体)，室温或 37℃孵育 10~15min。

(8) 重复步骤(6)。

(9) 滴加试剂 3(橙色液体)，室温或 37℃孵育 10~15min。

(10) 重复步骤(6)。

(11) 显色剂显色(DAB 或 AEC)。

(12) 自来水冲洗，复染，封片。切片可以于暗处 2~8℃保存。

(13) 显微镜下观察，记录结果。

此外，干细胞研究中还有其他的实验技术，如微阵列、免疫共沉淀、质谱分析技术、

蛋白质芯片技术、酵母双杂交技术、RNA 干涉等。

(姚海雷)

6.5 增殖分化调控机制的研究

6.5.1 载体的制备

目的基因的克隆是分子生物学实验中的核心内容，起着承上启下的作用，通过克隆技术可实现目的基因的无限扩繁、长期保存的目的；利用该技术能实现基因重组、基因改造、构建工程菌和转基因动植物。基因克隆技术主要包括载体的获取、酶切、脱磷、连接和转化及筛选、鉴定等内容(奥斯伯等 2001)。在干细胞增殖、分化调控机制的研究中常用到的克隆载体主要有以下两类：①宿主为大肠杆菌的细菌质粒；②动物细胞为宿主的动物病毒和以动物病毒为基础改造的穿梭质粒。

载体特点：①在宿主细胞中具独立复制能力；②带抗性等选择标记；③有合适的限制性内切核酸酶位点，可插入一定片段长度的外源 DNA 而不影响自身复制。

6.5.2 质粒提取

质粒 DNA 的提取方法比较常见，基本步骤多为三步：①细菌培养和质粒的扩增；②细菌菌体的裂解；③质粒 DNA 的纯化。现在常用的是质粒提取试剂盒。该方法方便、快捷，具体步骤可参考其使用手册。

注意：在质粒 DNA 提取中，质粒 DNA 的质量和产量在很大程度上受培养条件的影响，通过一些实验发现，下列培养方式能获得较好的结果。①培养应用菌龄不超过 4 天的平板单菌落作为起始菌。②培养菌应在 37℃、220r/min 下生长 16~18h。③不能用经储藏的培养菌直接进行质粒提取制备。

6.5.3 DNA 片段的酶切

限制性内切核酸酶(restriction endonuclease)是一类能识别双链 DNA 分子中特异核苷酸序列的 DNA 水解酶，是体外剪切基因片段的重要工具。

1) 主要设备与试剂

离心机、恒温水浴、电泳仪、电泳槽、质粒、TAE 缓冲液、限制性内切核酸酶。

2) 操作步骤

用于质粒的酶切鉴定，一般是 20μl 体积中含有 0.2~1μg DNA，酶切反应体系为：

质粒 DNA	10μl
缓冲液(10×)	2μl(双酶切时要选取两种酶都适合的缓冲液)
限制性内切核酸酶	1μl(双酶切时两种酶各加 1μl)
双蒸水	7μl

(1) 在 Ep 管中加入 7μl 双蒸水。

(2) 加入 10×缓冲液 2μl。

(3) 加限制酶 1μl。

(4) 加入质粒 10μl。

(5) 离心，混匀。

(6) 37℃水浴 1~2h。

(7) 取 2μl 反应液，电泳鉴定。

3) 注意事项

(1) 样品加入次序为水、缓冲液、DNA，最后为酶，不应颠倒。

(2) 加酶步骤要在冰浴中进行，在加酶前应先将水、缓冲液及待切 DNA 混匀。

(3) 反应体系的体积要尽量少，一般水解 0.2~1μg DNA 时，应将体积控制在 20~30μl 内。保证限制酶活性不受抑制。

(4) 为了控制反应体积和促进反应进行，要求模板 DNA 的浓度应很高，如底物 DNA 浓度过低则应进行浓缩。

(5) 本实验中双酶切时，因两种酶的缓冲液盐浓度要求相同，所以，可在同一反应体系中完成双酶切。但如进行双酶切时，两种酶所需缓冲液盐浓度要求不同，则不能将两种酶同时加入同一体系进行反应，此时可采取一种酶水解完后，进行有机溶剂抽提，沉淀、干燥后再复溶，然后进行第二种酶切。

6.5.4 DNA 片段回收

回收是指从电泳介质中纯化出目的片段。在试验中待回收的片段主要有酶切片段和各种 PCR 片段；回收的介质主要为琼脂糖；回收的方法主要有微量柱回收、玻璃奶回收。这里以玻璃奶法为例介绍 DNA 片段回收的方法。

1) 主要设备与试剂

离心机、烘箱、恒温水浴、玻璃奶、无水乙醇、溶胶液、漂洗液。

2) 操作步骤

(1) 从琼脂糖凝胶上切下目的条带放入 1.5ml Ep 管中，用一个 Tip 头捣碎。

(2) 准确估计凝胶的体积，加入 3 倍体积的溶胶液，室温放置 5min 或 50℃保温 3min，其间轻摇 Ep 管几次使胶完全溶化。

(3) 向溶胶中加入 10μl 玻璃奶，颠倒混匀，冰浴 10min，并且间隔 2~3min 颠倒混匀一次，12 000r/min 离心 30s，吸弃上清。

(4) 将浓缩漂洗液按 3∶7 与无水乙醇配成工作液，然后向玻璃奶中加入 250μl，用加样器吸漂洗液轻柔地将玻璃奶冲散混匀，12 000r/min 离心 30s，吸弃上清。

(5) 重复第(4)步一次。吸取完漂洗液后再离心 10s，用 Tip 头将最后一点儿漂洗液吸干净，然后放置于 37℃温箱中干燥 20min。

(6) 加 20μl 无菌水，用 Tip 头轻轻混匀，60℃水浴 5min，12 000r/min 离心 1min，回收上清即为纯化的 PCR 片段。−20℃储存。

3) 注意事项

(1) 玻璃奶使用之前一定要融化并充分混匀。

(2) 干燥后加无菌水后要充分吹打。

6.5.5 基因的重组连接

重组连接是指将目的基因用 DNA 连接酶连接在合适的质粒载体上，这是基因重组、基因改造的重要中间环节。连接反应可在溶液中进行也可在琼脂块中进行。在本部分仅以重组克隆为目的介绍相应的连接类型。在基因重组克隆中，外源 DNA 与载体的连接是承上启下的一步操作，根据连接片段末端类型不同，连接方式有黏端连接、平端连接、平黏端连接及单碱基配对的 T 载体连接等。

6.5.5.1 主要设备与试剂

离心机、恒温设备、T4 DNA 连接酶、10×T4 DNA 连接酶缓冲液。

6.5.5.2 操作步骤

6.5.5.2.1 连接

1) 取干净、灭菌 Ep 管，加入下列各试剂

T4 DNA 连接酶缓冲液	1μl
载体 DNA 片段	1ng
插入目的片段	$x$ng
连接酶	1U(平末端，如为黏端连接，则酶量可小于 1U)
加无菌水至	10μl

x = 目的片段与载体片段的分子比例×载体 ng 数×目的片段的碱基数/载体 ng 数

(目的片段/载体片段的分子比例一般为 3∶1)

2) 连接反应

22℃保温 3h 或 4℃过夜 (Promega 连接酶，黏端连接)；

或 22~26℃保温 1h (BRL 连接酶，黏端连接)；

或 22℃保温 4~16h (Promega 连接酶，平端连接)；

或 14℃保温 16~24h (BRL 连接酶)。

3) 注意事项

(1) 分子生物学实验中主要采用 T4 DNA 连接酶。

(2) 在分子生物学实验中连接酶主要用于：①基因重组中载体与外源基因的连接；②接头与 DNA 片段的连接，这种连接一般发生在文库构建、分子标记的 AFLP 及差异表达的研究中等。

(3) 其中黏端连接的效率最高，黏端连接与平黏连接中外源 DNA 片段在载体中的插入有方向性。平端连接的效率最低，且载体发生自连的比例较高，因此在克隆操作中为了克服平连的弊端，通常可通过：①TdT 酶在载体和外源 DNA 片段上转移—互补序列(核苷酸投影法)；②在载体和外源 DNA 片段上加上人工接头，变平连为黏连。

6.5.5.2.2 **连接产物的转化**

通过转化可以实现大量扩增质粒。转化的方法有多种，如电转化法、$CaCl_2$ 法等。一般使用 $CaCl_2$ 法，从而改变细胞膜的结构，使外源 DNA 可以穿过细胞膜进入细胞，然后在选择性培养基中培养转化处理过的细菌，转化成功的细菌可以在抗性培养基上生长形成菌落。

1) 主要设备与试剂

摇床、离心机、恒温设备、LB 培养液、$CaCl_2$(0.1mol/L)。

2) 操作步骤

(1) 从新鲜的平板上挑取一个 DH5α 单克隆，37℃摇振培养过夜。

(2) 按 1∶100 的比例将过夜培养的菌液加入新鲜的 LB 培养液中，于 37℃继续培养至 OD_{600} 为 0.3~0.4。

(3) 将菌液转移到预冷的 50ml 离心管中，4℃、1000*g* 离心 15min 回收菌体。

(4) 倒出上清，将管倒置 1min 以使最后残留的痕量液体流尽。

(5) 用 10ml 冰预冷的 0.1mol/L $CaCl_2$ 重悬每份沉淀，同上离心收集菌体。

(6) 重复步骤(4)。

(7) 每 50ml 初始培养物用 2ml 冰预冷的 0.1mol/L $CaCl_2$ 重悬，此即感受态细菌。

(8) 取 200μl 感受态细菌和 DNA(≤10μl，≤50ng)加入到一个冰冷的聚丙烯管中，轻轻旋转混匀，冰上放置 30min。

(9) 将管放到 42℃水浴中，恰恰放置 90s，其间不要摇动。

(10) 快速将管转移到冰浴中，冷却 1~2min。

(11) 每管加 800μl LB 培养液，37℃温和摇振培养 60min 使细菌复苏，并且表达质粒编码的抗生素抗性标记基因。

(12) 取 200μl 菌液涂在含 Amp 或 Kan 平板上，将平板置于室温直至液体被吸收，然后于 37℃倒置培养过夜。

3) 注意事项

(1) 热激温度和时间要严格控制好。

(2) 含 Amp 琼脂平板培养时间不应超过 16h，否则容易产生卫星菌落。

(3) 如果是与 T 载体的连接产物，则将菌液涂布在含 X-gal 和 IPTG 的 Amp 或 Kan 平板上。

6.5.5.2.3 **病毒载体的制备**(详见细胞转染部分)

1) 逆转录病毒载体的构建

(1) 改造病毒基因组，切除野生型的 *gag*、*pol*、*env* 结构基因，换为目的基因，保留包装信号和 LTRS 序列。

(2) 将重组的病毒载体导入包装细胞，包装出有感染能力的逆转录病毒颗粒。

(3) 从包装细胞培养上清中获得包装好的缺陷型病毒，用它转导带有该病毒受体的靶细胞，使目的基因稳定整合至靶细胞染色体。

注意：①插入的目的基因不能超过 7kb，否则逆转录病毒载体将不能有效包装。②外源基因导入靶细胞的效率很高，通常 1ml 含病毒的培养基可感染 10^6 个靶细胞。

2) 腺病毒载体的构建(这部分已经商品化，不做详细介绍)

(1) 构建含外源目的基因的腺病毒穿梭载体。

(2) 制备重组质粒。

(3) 转染 HEK293 细胞。

(4) 收获含重组腺病毒的上清进行滴度测定和纯化。

(5) 转染靶细胞。

注意：一般插入外源 DNA 长度不得超过 2kb，但是通过缺失部分病毒基因组可扩大外源 DNA 的插入容量。

6.5.6 蛋白质的制备

在干细胞增殖、分化调控机制的研究中，常需要进行目的蛋白质的表达。首先我们通过载体制备将目的基因插入表达载体，然后再将该重组载体导入活细胞，以大量表达所需目的蛋白质。

外源基因可以在原核表达，也可以在真核细胞中进行表达。外源基因的原核表达是目的基因在原核细胞中以发酵的方式快速、高效的合成基因产物，常用于原核表达的细胞是大肠杆菌。其特点是：操作简便，而且在较短时间可以实现蛋白质的大量表达，因此成为科研应用中蛋白质表达的主要宿主。但是大肠杆菌进行蛋白质表达也存在一些缺陷：①真核蛋白在大肠杆菌中的表达没有得到正确的修饰；②在大肠杆菌中表达蛋白时常形成沉淀成为包含体。

6.5.6.1 诱导

常用表达用宿主菌株为 DE3 BL21 菌，先要准备合适的感受态细胞，取质粒 1ng 用无菌水稀释 50 倍，按前述转化步骤进行操作，筛选出阳性克隆后提质粒并经 DNA 序列测定，确定无误后进行如下操作。

1) 主要设备与试剂

摇床、SDS-PAGE 电泳仪、离心机、LB 培养基、IPTG、Tris · HCl(20mmol/L pH8.0)、2×loading buffer。

2) 操作步骤

(1) 从新鲜的划线平板中挑取单克隆，接至一定体积的含合适抗生素的 LB 中，37℃摇床振摇培养至 OD_{600} 为 0.4~0.6。

(2) 如果表达载体的原核启动子为 PL 启动子，则在 30~32℃培养数小时，使培养液的 OD_{600} 达 0.4~0.6，迅速使温度升至 42℃继续培养 3~5h。如果表达载体的原核启动子为 tac 等，则 37℃培养细菌数小时达到对数生长期后加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L，继续培养 3~5h。

(3) 取出 1ml 菌液做分析用，1000*g* 离心 1min，沉淀加 100μl 2×loading buffer，100℃加热 3min，上样进行 SDS-PAGE。

(4) 将摇瓶置于冰上 5min。4℃、5000*g* 离心 5min 收集菌体，重悬细胞于 0.25 倍体积预冷的 20mmol/L Tris · HCl(pH8.0)中，离心。菌体保存于−70℃冻存以备分离基因表

达产物所用。

3) 注意事项

不同的表达质粒，因启动子不同，诱导表达方法并不完全相同，可根据具体情况而定。

6.5.6.2 细菌的裂解

细胞破碎是提取胞内产物的关键性步骤。常用的研究方法有酶溶法和超声破碎法。

6.5.6.2.1 酶溶法

酶溶法就是用生物酶将细胞壁和细胞膜消化溶解的方法。常用的溶解酶有溶菌酶(lysozyme)。

1) 主要设备与试剂

离心机，裂解缓冲液(1mmol/L EDTA，100mmol/L NaCl，50mmol/L Tris・Cl，pH8.0)，蛋白酶抑制剂(50mmol/L)，溶菌酶(10mg/ml)，脱氧胆酸，DNaseI(1mg/ml)。

2) 操作步骤

(1) 4℃、500*g* 离心 15min，收集诱导表达的细菌(1000ml)。

(2) 弃上清液，每克菌加 3ml 裂解缓冲液，悬浮沉淀。

(3) 每克菌加 3μl 50mmol/L 的蛋白酶抑制剂苯甲磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF)，80μl 溶菌酶(10mg/ml)，搅拌 20min。

(4) 在搅拌下，每克菌加 4mg 脱氧胆酸。

(5) 溶液变得黏稠时每克菌加 20μl DNaseI(1mg/ml)。

(6) 室温放置至溶液不再黏稠。

3) 注意事项

步骤(2)~(4)在冷室中进行。

6.5.6.2.2 超声破碎法

声频高于 15~20kHz 的超声波在高强度声能输入下可以进行细胞破碎，在处理少量样品时操作简便，液体量损失少，同时还可对染色体 DNA 进行剪切，大大地降低了液体的黏度，有利于后续目标产物的分离。

1) 主要设备与试剂

离心机、SDS-PAGE 电泳仪、TE buffer、2×loading buffer。

2) 操作步骤

(1) 收集诱导表达的细菌(1000ml)，4℃、500*g* 离心 15min。

(2) 弃上清液，每克菌加 3ml TE buffer。

(3) 根据厂家提供的超声波仪的数据进行破菌。

(4) 10 000*g* 离心 15min，分别收集上清液和沉淀。

(5) 取少量上清液和沉淀加入等体积的 2×loading buffer，进行 SDS-PAGE 电泳。

3) 注意事项

(1) 超声破碎与声频、处理时间、细胞浓度、菌种类型等许多因素有关，实验时要根据具体情况掌握。

(2) 超声波破菌前，细胞经数次冻溶后更容易破碎。

6.5.6.3 包含体的分离、溶解和复性

在以大肠杆菌为宿主菌高效表达外源基因时，表达蛋白常常在细胞质内聚集，形成包含体(inclusion body)。包含体形成后，表达蛋白不具有物理活性，因此必须溶解包含体对表达蛋白进行复性。由于包含体是致密的，易于沉淀，所以能用脱氧胆酸盐洗涤得到纯度较高的制备物。包含体离心沉淀后，可用尿素等洗涤。为获得可溶性的活性蛋白，必须要将洗涤过的包含体溶解，然后进行重折叠，最后用离子交换或亲和层析的方法对重折叠后的蛋白质进行精制。

6.5.6.3.1 分离

1) 主要设备与试剂

离心机、SDS-PAGE 电泳仪、尿素、Tris · Cl(0.1mol/L，pH8.5)、2×loading buffer。

2) 操作步骤

(1) 4℃、12 000*g* 离心细菌裂解液 15min。

(2) 弃上清液，每克菌加 1ml 无菌水使悬浮，分别取 100μl 分装 4 个管，其余备用。

(3) 离心同步骤(1)。

(4) 弃上清液，用 100μl 0.1mol/L Tris · Cl(pH8.5)，含不同浓度尿素(0.5mol/L、1mol/L)的溶液悬浮沉淀。

(5) 离心。

(6) 分别吸出并保留上清液，用 100μl H_2O 重新悬浮沉淀。

(7) 分别取 10μl 上清液和重新悬浮的沉淀，加 10μl 2×loading buffer 进行 SDS-PAGE 电泳。

6.5.6.3.2 包含体的溶解

1) 主要设备与试剂

SDS-PAGE 电泳仪，裂解缓冲液(含 0.1mmol/L PMSF，8mol/L 尿素，10mmol/L DTT)，KH_2PO_4(50mmol/L，pH10.7)，EDTA(1mmol/L，pH8.0)，NaCl(50mmol/L)。

2) 操作步骤

(1) 用 100μl 裂解缓冲液溶解包含体。

(2) 室温放置 1h。

(3) 加 9 倍体积的 PAGE 电泳缓冲液，室温放置 30min，用 KOH 保持 pH 为 10.7。

(4) 用 HCl 调至 pH8.0，最少在室温放置 30min。

(5) 室温、10 000*g* 离心 15min。

(6) 吸出上清液并保存，用 100μl 1×SDS-loading buffer 重新溶解沉淀。

(7) 取 10μl 上清液，加 10μl 2×loading buffer，取 20μl 重新溶解的沉淀，进行 SDS-PAGE 电泳。

6.5.6.3.3 复性

1) 主要设备与试剂

2mmol/L 还原型谷胱甘肽和 0.2mmol/L 氧化型谷胱甘肽。

2) 操作步骤

(1) 每毫升脲-蛋白溶解液缓慢加入 9ml 含 2mmol/L 还原型谷胱甘肽和 0.2mmol/L 氧

化型谷胱甘肽的工作缓冲液。

(2) 室温孵育 2~4h。

6.5.6.4 融合蛋白的纯化(以 GST 标签融合蛋白的纯化为例)

1) 主要设备与试剂

摇床、离心机、超声波发生器、LB 培养基、IPTG(100mmol/L)、Triton X-100(10%)、50%的谷胱甘肽-琼脂糖珠、还原型谷胱甘肽洗脱液。

2) 操作步骤

(1) 挑取一个菌落接种于 100ml LB/Amp 培养基中，在 37℃摇床中培养 12~15h。

(2) 以 1∶10 的比例将此培养物稀释于 1L 新鲜的抗性 LB 培养基中，分入 2 个 2L 的瓶中，37℃下培养 1h。

(3) 加 100mmol/L IPTG 至终浓度 0.1mmol/L，继续培养 3~7h。

(4) 室温、5000*g* 离心 10min 收集细胞，弃上清。沉淀重悬于 10~20ml 冰浴的 PBS 中。

(5) 将离心管置于冰浴中，用带直径 5mm 探头的超声波发生器裂解细胞。

(6) 加入 10%的 Triton X-100 至浓度为 1%并混匀。室温、10 000*g* 离心 5min 去除未裂解的细胞。

(7) 上清加入 1ml 50%的谷胱甘肽-琼脂糖珠混悬液，室温下轻柔混匀 2min。加 50ml 冰浴的 PBS 洗涤液、混匀，500*g* 离心 10s。重复洗涤 2 次。用少量(1~2ml)冰冷的 PBS 重悬琼脂糖珠，并移入一个 1.5ml 微量离心管中。

(8) 室温、500*g* 离心 10s 收集琼脂糖珠，弃上清。加 1ml 还原型谷胱甘肽洗脱融合蛋白质。轻柔混匀 2min，500*g* 离心 10s，收集上清，重复洗脱 2~3 次，经 SDS-PAGE 分析各部收集样品。洗脱的蛋白质分成小份，加甘油至终浓度 10%，储存于-70℃。同时测量吸光度确定融合蛋白的产量。

6.5.7 抗体的制备

一般来说，抗体制备主要分为两种：一种是用纯化的抗原免疫动物，获得多克隆抗体，这种方法在试验中比较常用；另一种是用杂交瘤技术制备单克隆抗体。

6.5.7.1 多克隆抗体的制备

一般用纯化抗原免疫动物，可以得到特异性抗血清。免疫动物的抗原虽然进行了纯化，可每种抗原分子常有多个抗原决定簇，可以刺激动物产生多种质量不同的抗体，因此异种抗血清是由多种抗体组成的混合物，这类抗血清称为多克隆抗体，在实验研究中应用较广。我们以常见的蛋白质抗原免疫家兔制备抗血清为例进行介绍。

1) 所用设备与试剂

注射器、眼科剪、止血钳、引流管、无菌的玻璃瓶、家兔、弗氏完全佐剂、麻醉剂、叠氮钠(NaN_3 0.02%)。

2) 操作步骤

(1) 选择动物：2.5~3kg 的健康家兔。

(2) 免疫动物：基础免疫所需抗原量为 0.5~1mg/kg，与弗氏完全佐剂以等体积乳化后做双后足掌注射及背部皮内多点注射。加强免疫，在第一次注射后 10 天，用前次相同的抗原量与弗氏完全或不完全佐剂乳化，做腋窝淋巴结内注射，每侧 0.1~0.2ml，剩余量做背部皮内多点注射，1~2 周后，再重复注射一次可不加佐剂，抗原剂量适当增加，注射途径可多点皮下、肌肉或静脉内加强免疫。以后每隔 1~2 周注射 2~3 次，末次注射后 7~10天试血，如果抗体效价不高，可再继续加强，直至达到要求的抗体效价(以双向扩散法检测，抗体效价在 1∶32 以上)，方可采血。

(3) 采血：颈动脉放血法。麻醉后将兔仰卧，四肢固定，充分暴露颈部，剪毛，消毒，沿气管表面做皮肤直切口，暴露气管，在气管旁剥离动脉与神经束。用止血钳夹住动脉的近心端，用丝线结扎远心端，用眼科剪在两端被阻断的血管上剪一“V”形小口，向心插入引流管用丝线将插管与血管固定，放开近心端管钳，收集血液于清洁无菌的玻璃瓶中，置室温，待血块收缩完全后分离血清，加最终浓度为 0.02%的叠氮钠(NaN_3)，小量分装，置-20℃冻存或冷冻干燥保存。

3) 注意事项

(1) 免疫用的动物多为哺乳类和禽类。哺乳类主要有家兔、豚鼠、猪及猴等。禽类常用鸡。

(2) 免疫动物所用的抗原要求尽量纯化。

(3) 目前用得最多的是弗氏佐剂，而弗氏佐剂又分为完全型和不完全型。

(4) 免疫动物需根据抗原的免疫原性强弱及抗原用量的多少，制定免疫方案。免疫的方案应包括注射的抗原量、途径、间隔时间和免疫次数。

6.5.7.2 单克隆抗体的制备

单克隆抗体(monoclonal antibody，McAb)有高度的均一性，特异性强。它是由抗原致敏的一个 B 淋巴细胞增殖而来的细胞系所产生的抗体。这是因为单抗是来源于一个 B 淋巴细胞的细胞株，而且其只对一种特定的抗原决定簇起反应，所以它具有高度均一性和特异性。不仅如此，杂交瘤细胞还能在体外或小鼠的腹腔内培养，产生大量抗体，易于标准化。

1) 所用设备与试剂

注射器、无菌培养皿、组织研磨器、计数器、恒温水浴、离心机、24 孔板、二氧化碳孵箱、BALB/C 小鼠、弗氏完全佐剂、无菌生理盐水、75%乙醇、RPMI-1640 培养液、5%小牛血清 1640 液、台盼蓝、50% PEG 溶液、20%小牛血清 HAT 选择培养液。

2) 操作步骤

(1) 动物免疫：常选用 BALB/C 小鼠，进行免疫，抗原用量根据所制备的抗血清的要求不同而异。常用 12.5~50μg/100μl，与等量弗氏完全佐剂混合，制成乳剂，用 200μl 做动物背部皮内多点注射，如果注射量大，可做皮下注射。一般间隔 1~3 周注射一次，共 3~5 次，末次接种后一周，切断小鼠尾巴尖部，放血，检测抗血清的特异性和效价。选择产生高质量抗血清的小鼠作为脾细胞的来源。被选小鼠在试血后的 3~6 天，用同一

剂量的抗原以无菌生理盐水溶解做静脉加强注射一次，使抗原刺激的B淋巴细胞定位于脾脏。3~4天后，处死动物，制备脾细胞。

(2) 脾细胞制备：将免疫的小鼠处死，浸入75%乙醇，5min换乙醇一次，在无菌条件下取出脾脏，用RPMI-1640培养液冲洗表面血液，去包膜，将脾脏放入盛有培养液的无菌培养皿中，剪碎移入15ml的组织研磨器中，加新配的5%小牛血清1640液，挤压脾组织块，制备细胞悬液，收集细胞悬液静置片刻，待组织碎片下沉后，吸取上层含细胞的悬液用5%小牛血清1640液洗2次，沉淀再悬浮于1ml培养液中并用台盼蓝染色，计数，要求活细胞占90%以上。

(3) 骨髓瘤细胞制备：从处于对数生长期的NS-1小鼠骨髓瘤细胞株培养液中取细胞2×10^7~4×10^7个，加5%小牛血清1640液离心10min，去上清，将沉淀重悬计数。

(4) 细胞融合：取脾细胞10^8和骨髓瘤细胞2×10^7~4×10^7个，放入50ml试管中，加RPMI 1640液离心10min，去上清，使管底沉淀松散，混匀，置37℃水浴中。取50% PEG溶液0.8ml，边搅拌边加入，加完后继续搅拌1.5~2min，使细胞凝聚。加1640培养液，再加未温浴含5%小牛血清1640培养液稀释，终止PEG作用，然后离心10min，去上清。加20%小牛血清HAT选择培养液(含青霉素和链霉素各100U/ml) 30ml，饲养细胞10ml(含细胞数为2×10^7~4×10^7个/m1，饲养细胞可用小鼠腹腔巨噬细胞或未免疫小鼠脾细胞)混匀，分配到24孔板，每孔加0.5ml，置37℃含5%~7%二氧化碳孵箱中培养。经HAT选择性培养后，融合的杂交瘤细胞生长良好，而亲代的脾细胞和骨髓瘤细胞死亡。培养7~10天后，在倒置显微镜下观察，见融合细胞已覆盖1/3~1/4孔底面积时，开始测抗体活性，应反复测定2~3次，以确定抗体阳性孔。选出抗体阳性孔的细胞，一部分做克隆化培养，一部分用液氮冷冻保存。

(5) 克隆化培养：常用有限稀释法(limiting dilution)将抗体阳性孔的细胞进行准确计数，使细胞数达到10个/ml，然后根据所做96孔板的数量，计算所需15%小牛血清1640培养液与杂交瘤细胞的量，将细胞悬液分配到96孔板，每孔0.1ml。使平均每孔有1个细胞，再加入饲养细胞，一起培养7~14天，待细胞克隆出现，并覆盖1/3~1/4孔底时，再次检测培养液中的抗体活性。并将抗体阳性克隆化细胞再克隆培养。一般至少应进行再克隆培养2次以上，按这种方法分配，将得到由单个细胞产生的克隆。

(6) 扩大培养：当找到抗体阳性克隆，应立即扩大培养，收获McAb。扩大培养制备McAb的方法有：①抗体阳性细胞体外培养，收集培养液，但产量甚微，1~20μg/ml；②腹水培养阳性细胞。具体操作是将无菌石蜡油0.5ml，注入小鼠腹腔，造成无菌性炎症，于注射后1~2周，取10^6~10^7个抗体阳性细胞用0.5ml生理盐水稀释，注入小鼠腹腔，待产生大量腹水后，用注射器抽取腹水，每2~3天抽一次，可得到大量的McAb。再经双向免疫扩散，免疫电泳及聚丙烯酰胺圆盘电泳，进行抗体鉴定，然后冷冻干燥，−20℃保存。

(7) 冷冻保存与复苏：冷冻应采用逐渐降温法，各实验室使用的方法大同小异。将细胞装入冰存管，加用小牛血清配制的10%~15%二甲亚砜(dimethyl sulfoxide，DMSO)，作为细胞保护剂。再将细胞从室温转到4℃、−20℃、−40℃，在−40℃放置6~24h后直接放入液氮中。复苏时，将盛有细胞的冻存管从液氮中取出，立即投入37℃水浴中，见已冻融迅速取出，将细胞转入10ml离心管中，加10ml完全培养基，1200r/min离心5min，

然后将细胞转入培养瓶中培养。

3) 注意事项

(1) 作为免疫的小鼠应与骨髓瘤源自同一品系，这样克隆化的杂交瘤细胞，接种到小鼠才易于增殖，且容易获得高质量的单克隆抗体。

(2) 挤压脾组织块，制备细胞悬液时只能挤压不能研磨。

(3) 用来制备 McAb 的骨髓瘤细胞是 BALB/C 小鼠的浆细胞瘤，瘤细胞内缺乏 HGPRT 酶。目前已筛选出许多不同的骨髓瘤细胞株。制备 McAb 应选择不分泌或不合成小鼠 Ig 重链、轻链的骨髓瘤细胞株，常用的有 NS-1、SP2/0 和 653 等。

(4) 检测抗体活性，可用放射免疫法，免疫组织化学法、血凝法和细胞毒试验等手段。

6.5.8 细胞转染

在研究中会需要将外源 DNA 导入不同类型的细胞，从而分析其表达并在细胞水平上研究它对细胞生长的影响。外源 DNA 通常包括基因组 DNA、克隆的目的基因和寡核苷酸等。实验中常用的方法主要分为两种：物理化学法和病毒载体法。在物化方法中除 DEAE-葡聚糖介导法只适合瞬时转染外，其他各种物化方法既可用于瞬时也可用于稳定转染；而不同的病毒载体法，有的适用于稳定转染(如逆转录载体法)，有的适用于瞬时转染(如腺病毒载体法)。

实验中比较常用的是磷酸钙沉淀法和 DEAE-葡聚糖介导法、电穿孔法、脂质体介导法。

6.5.8.1 物理化学方法

6.5.8.1.1 磷酸钙沉淀法

磷酸钙沉淀法的机制还不完全清楚，可能是 Ca^{2+}-DNA 结合物形成的颗粒沉积在培养细胞的表面，导致细胞的非特异性内吞作用。

HEPES 缓冲溶液系统的磷酸钙沉淀法——用该方法转染的 DNA 既可以是基因组 DNA 也可以是质粒 DNA。

1) 所用设备与试剂

CO_2 培养箱、无菌培养皿、离心管、培养基、$CaCl_2$(2.5mol/L)、2×HEPES-$NaCl_2$ 溶液(HBS 组成：280mmol/L NaCl，10mmol/L KCl，1.5mmol/L Na_2HPO_4，12mmol/L 葡萄糖，50mmol/L HEPES)。

2) 操作步骤

(1) 转染前 24h 内，按 1×10^6 个细胞/培养皿的密度接种 100mm 的培养皿，37℃、5% CO_2 培养过夜。在加入沉淀前 2~4h，换用新鲜的培养基培养细胞。

(2) 将需要转染的 DNA 用乙醇沉淀(10~50μg/皿)，空气中晾干。将 DNA 沉淀重悬于 450μl 灭菌水中，加入 2.5mol/L $CaCl_2$ 50μl。

(3) 取 2×HBS 500μl 于一无菌的锥形管中，一边吹打 2×HBS，一边逐滴加入 DNA/$CaCl_2$ 溶液，随即涡旋 5s，将其在室温下静置 20min 以形成沉淀。

(4) 将沉淀均匀加入长满细胞的 100mm 培养皿中，轻轻晃动。

(5) 在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养细胞 4~16h。除去培养基，PBS 洗细胞 2 次，加 10ml 完全培养基培养细胞。

(6) 对于瞬时转染，可在转染后 48~72h 收集细胞，并进行表达分析。对于稳定转染，让细胞生长 2 个倍增时间(当被转染细胞是贴壁细胞时，倍增时间一般为 18~24h)后分入培养皿中进行培养。

3) 注意事项

(1) 转染用 DNA 需进行纯化，不纯将影响转染效率。

(2) DNA-磷酸钙的比例不当会影响转染效率。

(3) 转染质粒 DNA 时可加入特定的基因组 DNA(载体 DNA)提高转染效率。

6.5.8.1.2 DEAE-葡聚糖介导法

二乙胺乙基葡萄糖简称 DEAE-葡聚糖，是在生理 pH 条件下带正电荷的多聚阳离子试剂，它能促进靶细胞摄入外源 DNA，其机制推测是 DNA 与 DEAE-葡聚糖结合易于被靶细胞内吞，并减少细胞内核酸酶对 DNA 的降解作用。该法只适用于瞬时转染，所需 DNA 比磷酸钙沉淀法少，且不使用载体 DNA。

1) 主要设备与试剂

CO_2 培养箱；无菌培养皿；离心管；Tris 缓冲盐溶液(TBS)(溶液 A：NaCl 8g，KCl 0.38g，Na_2HPO_4 0.2g，Tris 3g，用 HCl 调节 pH 至 7.5，定容至 100ml，过滤除菌。溶液 B：$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.5g，$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1g，定容至 100ml，过滤除菌。取上述 10ml A 液加入三蒸水 89ml，再加 1ml B 液体，即配制好 TBS，使用前过滤除菌)。

2) 操作步骤

(1) 取 5×10^5 个细胞接种于 100mm 培养皿，37℃、5%CO_2 培养 3 天，达到 30%~50% 融合。

(2) 乙醇沉淀 4μg 质粒 DNA，空气干燥，溶于 40μl TBS 中。

(3) 吸去细胞培养上清液，用 1×PBS 洗涤细胞，加入完全培养基。

(4) 边摇动边将 DNA 缓慢加入 80μl 预热至 37℃的 10mg/ml DEAE-葡聚糖溶液中，再将 120μl DNA/DEAE-葡聚糖混合液逐滴加入每个培养皿中，轻轻转动培养皿使其分布均匀，置 37℃、5%CO_2 培养 4h。

(5) 吸去含 DNA/DEAE-葡聚糖的细胞培养基，加入 5ml 含 10%DMSO 的 1×PBS，室温静置 1min，吸去含 DMSO 的 PBS，用 5ml PBS 漂洗细胞一次，加 10ml 完全培养基继续培养 48~72h。根据实验目的，在适当的时间收获细胞，用于分析基因的瞬时表达。

3) 注意事项

(1) DEAE-葡聚糖有较强的毒性，所以常采用低浓度(100~400μg)长时间(4~8h)处理的方案。

(2) 为了提高转染效率可以加入氯奎，它可以保护 DNA/DEAE-葡聚糖不被溶酶体降解。

6.5.8.1.3 电穿孔法

该法是将细胞置于高压电场，在电脉冲的作用下，使细胞膜瞬间出现微小的孔洞，

使外源 DNA 进入细胞。影响电穿孔法基因转移效率的因素有多个，其中电脉冲影响最大。电穿孔转染的效率取决于受体细胞的类型、转染用的 DNA 构象等。

1) 主要设备与试剂

低温离心机、电穿孔用的电击仪和电击池、含或不含有选择药物的完全培养基、电穿孔缓冲液[可根据实验所用的细胞类型，选用不同的电穿孔缓冲液，一般无血清和抗生素的细胞培养基，其电击条件为：电容 960μF，电压 250~450V(625~1125V/cm)]。

2) 操作步骤

(1) 培养靶细胞至对数生长中期，4℃、680*g* 离心 5min 收集细胞。

(2) 将细胞沉淀用预冷的电穿孔缓冲液重悬洗涤 1~2 次，4℃、680*g* 离心 5min 收集细胞。

(3) 对于稳定转染，将细胞以 1×10^7 个/ml 的密度重悬于预冷的电穿孔缓冲液中。对于瞬时表达，可用更高密度的细胞。

(4) 冰上放置所需数量的电击池，分 0.5ml 细胞悬液/池。

(5) 将线状或超螺旋的 DNA(DNA 应经过纯化)加入冰上放置的含细胞悬液的电击池中。握住电击池的两侧，晃动以混匀 DNA/细胞悬液，在冰上放置 5min。

(6) 将电击池放入电击仪的池架上(室温)，用所设定的电压及电容值电击一次或多次。电击的次数及电压和电容的设定随细胞类型而异，需进行摸索。

(7) 将电击池置于冰上 10min。

(8) 用非选择性完全培养基 20 倍稀释被转染细胞，并用该培养基洗电击池数次，以移出所有的被转染细胞。然后，于 37℃、5% CO_2 培养细胞。

(9) 瞬时转染可于培养 48~72h 后收获细胞，以分析基因的表达，稳定转染实验可采用含有特殊药物的选择性培养基进行抗性细胞克隆的筛选。

3) 注意事项

(1) DNA 浓度应控制在 1~40μg/10^7 个细胞范围内，且线状 DNA 转染成功率较高。

(2) 目前对于动物细胞进行电穿孔，一般采用长脉冲/低电场方法。

6.5.8.2 脂质体介导法

将需要转移的 DNA 等生物大分子包裹于脂质体，由于脂质体具有磷脂双层结构(与细胞膜类似)，因此可与细胞膜融合，将 DNA 等生物大分子转入靶细胞。单阳离子脂质(如 DOTMA、DOTAP 等)及中性磷脂(常见的为 DOPE)可与 DNA 形成类脂复合物，从而使 DNA 更有效地进入细胞。目前阳离子脂质转染试剂已商品化，转染率比其他转染方法更高，重复性更好。

1) 使用设备与试剂

培养皿、CO_2 培养箱、培养基、商品化阳离子脂质转染试剂。

2) 操作步骤

(1) 以 1×10^5~3×10^5 个/孔在 6 孔板或 35mm 培养皿中接种生长状况良好的靶细胞，于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 18~24h，至细胞 50%~80%汇片。

(2) 在 Ep 管中配制 DNA/脂质体复合物，体系如下：稀释 1~2μg 质粒 DNA 至 100μl 无血清 DMEM 培养基中。同时稀释 2~25μl 阳离子脂质于 100μl 无血清 DMEM 培养基中，

然后将二者混合，轻轻混匀。在室温下孵育15~45min，使DNA与阳离子脂质结合。

(3) 吸去细胞的原培养基，用2ml无血清DMEM培养基洗细胞一次，在每一个孔或35mm培养皿中加入0.8ml无血清DMEM培养基，然后逐滴加入上述DNA/脂质体复合物，并使之均匀分布。于37℃、5% CO_2培养箱中培养3~8h，一般为5h。

(4) 每孔或直径35mm培养皿中加入1ml含20%胎牛血清的DMEM完全培养基，置37℃、5% CO_2培养箱中再培养18~24h。此过程中若有细胞毒性，必须更换新鲜的含10%胎牛血清的DMEM完全培养基。

(5) 吸去DNA/脂质体复合物的DMEM完全培养基，每孔加入2ml新鲜的含10%胎牛血清的DMEM完全培养基，再培养24~48h。

(6) 瞬时转染实验可在转染开始后48~72h收获细胞，以分析基因的表达；稳定转染实验可于转染后72h，将细胞按1∶10分入含有特殊药物的选择性完全培养基进行抗性细胞克隆的筛选。

3) 注意事项

(1) 一般先加入无血清培养基，再加入未稀释的阳离子脂质体试剂。

(2) 如果待转染的细胞不耐受无血清培养基，可以先在无血清培养基中制备DNA/脂质体复合物，然后将其加入含血清的完全培养基中进行转染。

6.5.8.3 病毒载体法

6.5.8.3.1 逆转录病毒载体法

基因组结构简单，易于操作，感染宿主范围广且效率高，但是只能感染分裂复制的细胞，滴度较低。此外，在包装细胞中，逆转录病毒载体有可能通过同源重组未野生型辅助病毒，有潜在的致癌危险性。

1) 使用设备与试剂

CO_2培养箱、培养皿、培养板、克隆环、培养基、HEPES缓冲盐溶液(HBS)其组成如下[137mmol/L NaCl，5mmol/L KCl，0.7mmol/L Na_2HPO_4，6mmol/L 葡萄糖，21mmol/L HEPES，2mol/L $CaCl_2$，800μg/m1(100×)聚凝胺(过滤除菌)，含15%甘油的HBS]。

2) 操作步骤

(1) 转染前1天，在100mm培养皿中1∶5或1∶10接种包装细胞培养至10%~20%汇片。

(2) 将10μg含有药物抗性基因的逆病毒载体质粒DNA加入预先有0.5ml HBS的试管中，再加入32μl 2mol/L $CaCl_2$，轻摇。室温下孵育45min，直到形成细小的淡蓝色沉淀。

(3) 移去包装细胞的培养基，吸取HBS-DNA沉淀轻加在培养皿中央。在超净工作台内让细胞接触DNA 20min，期间轻轻转动培养皿以均匀分散DNA溶液。加10ml培养基，将细胞置于37℃、5%CO_2培养4h。

(4) 吸尽培养基，轻轻加入2.5ml室温的HBS/甘油。将培养皿放回培养箱中孵育1.5~3.5min。快速弃除HBS/甘油，用10ml培养基轻轻洗2次，加5ml含有血清的培养基，培养18~24h移出培养基，用0.45μm的滤器过滤，获得含有短暂产生的病毒；将其保存于−70℃或−80℃。

(5) 在转染的细胞中加 10ml 培养基，培养 2~3 天。

(6) 在感染前 1 天，将包装细胞系[与第(1)步所用的细胞系的 env 类型不同] 按 1∶10 至 1∶20 传代。

(7) 移去所要感染的包装细胞系的培养基。加病毒[从第(5)步来]如下，对于一只 100mm 的培养皿，稀释 0.1~1.0ml 病毒液至终体积 3~5ml，并加 800μg/ml 的聚凝胺至 8μg/ml；对于 60mm 的培养皿，稀释 0.1~1ml 病毒液至终体积 2ml，并加 800μg/ml 的聚凝胺至终浓度 8μg/ml。37℃、5%CO_2 培养 1h 以上。

(8) 在感染后 2~3 天，按 1∶10 或 1∶20 将感染的细胞传代，加选择性培养基培养 3 天，换用新鲜的选择培养基，再培养 4~7 天直至可见到细胞克隆。

(9) 用克隆环挑取分离良好的细胞克隆，每个克隆转移至 2 个 24 孔培养板或 6 孔培养板的培养孔中，生长至 50%~90%汇片。

(10) 更换 1/2 体积的培养基，视包装细胞系不同而培养 1~3 天，移出培养基，或对其进行滴度测定，或保存于−70℃或−80℃。

(11) 继续传代各产病毒细胞克隆，直至其可冻存或直至鉴别出最好的产病毒细胞。当鉴定出一个好的产病毒细胞克隆时，加 10%~15% DMSO 在液氮中冻存。

3) 注意事项

(1) 如果感染持续时间超过 6h 甚至过夜，应使用更多体积的感染混合液，以防细胞脱水。

(2) 待感染靶细胞的接种数和感染混合液用量随培养皿的底面积而改变。

(3) 用几种量的病毒液(如 0.1ml、0.4ml、1.0ml)感染几只培养皿，对于小鼠逆转录病毒和禽类逆转录病毒的 E 亚群需添加聚凝胺，对于禽类的其他亚群则不需要聚凝胺。如果细胞对于聚凝胺不敏感(大多数包装细胞都如此)则延长培养时间，不会损害细胞。

(4) 如果细胞对于聚凝胺不敏感，则加培养基以增加体积。对于 100mm 培养皿加培养基至终体积 10ml，对于直径 60mm 培养皿加 4ml，培养 2~3 天。

6.5.8.3.2 腺病毒载体法

腺病毒可以感染分裂细胞和未分裂细胞，插入的外源 DNA 容量大。容易获得较高的滴度，病毒颗粒较稳定，但是其不足也比较明显，外源基因表达是暂时的，而且其体内应用容易引起免疫反应等。

1) 使用设备与试剂

CO_2 培养箱、培养板或培养皿、人胚肾(HEK 293)细胞系、阳离子脂质体转染试剂。

2) 操作步骤

(1) 在 6 孔培养板或直径 35mm 培养皿中接种约 5×10^5 个 HEK 293 细胞，5% CO_2 培养箱中培养 24h。

(2) 提取重组病毒质粒 DNA 10μg，用 *Pac* I 酶切使之线性化。

(3) 按照厂家说明用 lipofectamine(GIBCO 公司)进行转染 293 细胞。

(4) 7~10 天后用荧光显微镜进行观察，可以看到多数 293 细胞中有 GFP 的表达。

(5) 收取细胞，在−70℃/37℃条件下反复冻融 4 次裂解细胞，离心取含病毒的上清再次感染 293 细胞以扩增重组病毒。

(6) 3 天后收集细胞，反复冻融 3 次。

(7) 取 400μl 稀释液加至 293 细胞培养瓶中，于 37℃孵育 3h，换新鲜培养基继续培养 18~24h，于荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数，按以下公式计算病毒滴度：

病毒滴度 = GFP 细胞阳性数×病毒上清稀释倍数/0.4ml (pfu/ml)

3) 注意事项

收集毒液后可以进行纯化，用 CsCl 密度梯度超离心法进行病毒的纯化，将浓缩后的病毒储存液作不同比例的稀释。

6.5.9 定位研究

定位研究的方法主要有荧光显微术、原位杂交、电子显微术。这里主要介绍通过荧光显微镜进行观察研究的方法，其试验策略是利用免疫学和非免疫学的荧光探针所具有的敏感性和特异性来揭示结构与功能的关系。

6.5.9.1 内源性酶检测

6.5.9.1.1 *β*-半乳糖苷酶活性检测

β-半乳糖苷酶是经典的组织化学报道基因，其活性可以用多种底物来检测。最常用的是 X-gal。当 *β*-gal 水解 X-gal 分子的糖苷键时，会产生一种可溶性的、无色的吲哚单体。随后，两个游离的吲哚基团无需酶促催化，即可自发氧化形成二聚体。最终形成的卤化靛青是一种极稳定且不溶于水的蓝色复合物。

1) 整块组织(如胚胎)的 X-gal 染色

(1) 使用设备与试剂：含有 2mmol/L $MgCl_2$ 的 PBS、2%~4%多聚甲醛、X-gal 反应缓冲液(35mmol/L 亚铁氰化钾、35mmol/L 铁氰化钾、2mmol/L $MgCl_2$、0.02% NP-40、0.01%脱氧胆酸钠)、X-gal 储存液(40mg/ml X-gal 溶于 DMF)。

(2) 操作步骤：

a. 将组织在冰上预冷的含有 2mmol/L $MgCl_2$ 的 PBS 中剪碎。

b. 在 2%~4%多聚甲醛中冰上固定 30min 到几个小时。

c. 用 PBS 漂洗几遍。

d. 用 X-gal 反应缓冲液稀释 X-gal 储存液，与组织在 37℃孵育 2~4h。

e. 在 PBS 漂洗多次，直到漂洗液不再发黄为止。最好过夜漂洗。

f. 在明视野的显微镜下观察。

(3) 注意事项：

a. 固定时间不宜太久。

b. 在 X-gal 反应中加入 NBT 以替代铁离子，会形成紫色沉淀，这一反应比单用 X-gal 反应更快更敏感。

2) 组织切片的 X-gal 染色

(1) 使用设备与试剂：明胶蔗糖包埋液(7.5%明胶、15%蔗糖、0.05%叠氮钠)、包被载玻片的明胶溶液(2g 明胶，0.1g 硫酸铬钾溶于 200ml 水)、4%多聚甲醛、Gelvatol(①取

200ml 0.01mol/L KH_2PO_4 pH5.0，加入足量的 0.01mol/L Na_2HPO_4 使 pH 至 7.2；②取 250ml 0.01mol/L KH_2PO_4/Na_2HPO_4，加 2.05g NaCl，使 NaCl 终浓度为 0.14mol/L；③在 250ml 0.01mol/L KH_2PO_4/Na_2HPO_4/0.14mol/L 14mol/L NaCl 中溶解 62.5g Gelvatol，用磁力搅拌器在室温搅拌几个小时；④加入相当与上述溶液体积一半的甘油，室温搅拌过夜；⑤将上述溶液转移到加盖的 Corex 离心管里，室温、120 000 r/min 离心 15min，检测 pH，应为 6.0~7.0)。

(2) 操作步骤：

a. 按上文用固定剂固定组织。

b. 用 OCT(Miles)或明胶/蔗糖包埋液包埋组织，放在经液氮预冷的金属格中冷冻。

c. 冰冻切片，将切片固定在经硅烷包被，过夜风干的切片上。

d. 在 4℃的 4%多聚甲醛中作用 10 ~15min，使切片固定在载玻片上。

e. 将载玻片在 4℃的 PBS+Mg^{2+} 中漂洗 2 次，每次 10min。

f. 将载玻片在 X-gal 反应缓冲液中染色 1~24h。

g. 用 PBS 漂洗载玻片 3 次，每次 10min。

h. 用 Gelvatol 封上盖玻片。

(3) 注意事项：

a. 如对培养的细胞进行染色，将细胞用 4%多聚甲醛在室温固定 5min，再进行以下的操作。

b. 当标本较大不能对整个组织进行染色时可以采用切片染色。

6.5.9.1.2 碱性磷酸酶活性检测(PLAP)

内源性碱性磷酸酶活性的存在会导致对转导的 PLAP 的检测困难，多数情况下可以通过加热或加入化学抑制剂来降低本底，PLAP 经过这些处理仍可保持活性。

1) 整块标本的 X-Phos/NBT 染色

(1) 使用设备与试剂：X-Phos/NBT 检测缓冲液(100mmol/L Tris · HCl pH9.5，100mmol/L NaCl，50mmol/L $MgCl_2$)，X-Phos/NBT 反应缓冲液(100×X-Phos 储存液 50μl，50×NBT 100μl，X-Phos 检测缓冲液)。

(2) 操作步骤：

a. 剪碎组织块并固定。

b. 组织在 65℃中加热至少 30min。

c. 在 X-Phos/NBT 检测缓冲液中室温孵育 15min。

d. 在 X-Phos/NBT 反应缓冲液中室温孵育 1 至数小时。

e. 在 20mmol/L EDTA-PBS 中漂洗 2~4h。

2) 组织切片 X-Phos/NBT 染色染色

(1) 操作步骤：

a. 按上述方法进行到步骤 d。

b. 将载玻片转移到 65℃预热的 PBS 中热处理 30min。

c. 用室温的 PBS 漂洗 5min。

d. 在 X-Phos/NBT 检测缓冲液中漂洗 10min。

e. 载玻片在 X-Phos/NBT 反应混合液中室温染色 1~12h。

f. 用 PBS+20mmol/L EDTA 漂洗玻片3遍，每次 10min。

g. 用 Gelvatol 封固。

(2) 注意事项：

a. 染色过程及染色后要用铝箔遮盖。

b. 玻片放在-80℃保存有助于防止本底着色的提高。

6.5.9.2 蛋白质免疫定位

在光镜和电镜水平上对细胞或组织中的抗原进行定位的研究中，过氧化物酶和碱性磷酸酶常用于直接耦联在二抗上作为报道分子。检测过氧化物酶的活性常用联苯胺(DAB)作为电子受体，以过氧化氢作为底物。在存在酶活性的部位可以观察到棕色的反应沉淀物。碱性磷酸酶活性的检测常用 BCIP/NBT(5-溴-4-氯-3-吲哚盐/氯化硝基四氮唑蓝)作为底物，在酶活性存在的部位产生一种深黑/紫色沉淀。

6.5.9.2.1 用过氧化物酶耦联抗体进行蛋白质的定位

1) 所用设备与试剂

多聚赖氨酸包被的盖玻片，培养板，2%甲醛，0.01%、0.1%、0.25%或 0.5%戊二醛-PBS 溶液(pH7.4)，0.3mol/L 甘氨酸，0.5% Triton X-100，0.5% NGS-PBS，0.05mol/L Tris · HCl(pH7.6)。

2) 操作步骤

(1) 在已经放有多聚赖氨酸包被的盖玻片的培养板内培养细胞。

(2) 用 2%甲醛，0.01%、0.1%、0.25%或 0.5%戊二醛-PBS 溶液(pH7.4)来固定细胞，室温 20min。

(3) 用 0.3mol/L 甘氨酸洗细胞 3 次，每次 10min，以减少游离的醛类。

(4) 用 0.5% Triton X-100+0.5% NGS-PBS 对细胞进行透化处理，冰浴 5min。

(5) 用 PBS+1%NGS 洗 3 次，每次 10min。

(6) 在室温与第一抗体孵育 1h。

(7) 用 PBS+1%NGS 洗 3 次，每次 10min。

(8) 与 1∶50 稀释的过氧化物酶耦联的二抗室温孵育 1h。

(9) 用 PBS 洗 3 次，每次 10min。

(10) 用 0.05mol/L Tris · HCl(pH7.6)洗 2 次，每次 10min。

(11) 放入 DAB+H_2O_2 中孵育直到形成足够满意的反应产物。

(12) 用 0.05mol/L Tris·HCl(pH7.6)洗 3 次，每次 10min。

(13) 用 PBS 洗 10min。

(14) 用含有 2%戊二醛的 PBS 室温固定 20min。

(15) 用 PBS 洗 2 次，每次 10min。

(16) 封固。

6.5.9.2.2 用碱性磷酸酶耦联抗体进行蛋白质的定位

1) 所用设备与试剂

buffer 1(150mmol/L NaCl，100mmol/L Tris · HCl pH7.5)；buffer 2(100mmol/L Tris · HCl pH9.5，100mmol/L NaCl，50mmol/L $MgCl_2$)；2ml BCIP/NBT。

2) 操作步骤

(1) 按上述方法进行(1)~(7)操作。

(2) 与 1∶50 稀释的碱性磷酸酶耦联的二抗室温孵育 1h。

(3) 用 PBS 洗 3 次，每次 5min。

(4) 在室温用 buffer 1 洗 2 次，每次 15min，随后在 buffer 2 中室温平衡 1min。

(5) 将细胞与 2ml BCIP/NBT 溶液孵育，室温振荡显色。

(6) 定时用显微镜检查显色情况。通常的温育时间 5~120min。

(7) 用含有 20mmol/L EDTA 的 PBS 冲洗以终止反应。将盖玻片封固进行显微镜观察。

3) 注意事项

(1) 以上方法的优点在于酶/抗体复合物能够容易的渗透入细胞内并定位在其靶位，有高度敏感性。

(2) 遇到的问题是内源性细胞酶活性的存在及对反应产物的检测结果模棱两可。

6.5.9.3 原位杂交

原位杂交(*in situ* hybridization)是以目标核酸的互补序列为探针，对细胞制品进行杂交处理，使目标核酸可被呈现的技术。

6.5.9.3.1 所用设备与试剂

杂交液、4%多聚甲醛、0.2mol/L HCl、0.1%~0.3% Triton X-100、蛋白酶 K、乙醇、50%甲酰胺、柠檬酸钠、buffer 1、buffer 2、buffer 3、TE buffer。

6.5.9.3.2 操作步骤

1) 探针的标记

选用地高辛(digoxingenin)标记的 dUTP，PCR 方法进行标记，玻璃奶方法回收目的片段(地高辛标记的探针比非标记的 PCR 产物稍大)。

2) 细胞片的处理

(1) 取出培养约 36h 的(HeLa)细胞爬片置于一个载玻片上，PBS(pH7.2)洗涤 3 次，空气中放干。

(2) 4%多聚甲醛室温固定 10~30min。

(3) 0.2mol/L HCl 室温下作用 10min，0.1%~0.3% Triton X-100(PBS 配制)通透 15min。

(4) 用含 0.2%甘氨酸的 PBS 室温孵育 15min。

(5) 蛋白酶 K[1μg/ml，0.1mol/L Tris · Cl(pH8.0)+50mmol/L EDTA(pH8.0)配制]37℃消化 30min。

(6) 含 0.2%甘氨酸的 PBS 室温孵育 10min。

(7) PBS-5mmol/L $MgCl_2$ 洗 2 次，各 10min。

(8) 4%多聚甲醛室温固定 15min。

(9) PBS-5mmol/L $MgCl_2$ 洗 2 次，各 15min。

(10) 逐级乙醇脱水(70%、80%、90%、95%、100%各 5min)，空气中干燥。此玻片可直接用于杂交，也可保存于 4℃备用。

3) 杂交

将约 2ng 标记好的探针用 50μl 杂交液稀释。

杂交液：

甲酰胺	5ml
20×SSC	2ml
50×Denhardt(1g 聚蔗糖，1g 聚乙烯吡咯烷酮，1g BSA，100ml H_2O，分装后−20℃冻存)	0.2ml
鲑精 DNA	0.75ml
50%硫酸葡聚糖(2.5g/5ml H_2O)	2ml
(分装后−20℃冻存)	9.95ml

(1) DNA 检测：玻片与探针于 95℃加热 10min 同时进行变性；

(2) RNA 检测：将 95℃加热 10min 变性后的探针加在玻片上；

(3) 将玻片放置于湿盒中，37℃杂交过夜。

4) 清洗和检测

(1) 将玻片从 37℃湿盒中取出，于 37℃换 3 次 50%甲酰胺/2×SSC 清洗，每次 5min；20×SSC：17.5g NaCl，8.82g 柠檬酸钠，调节 pH7.0~7.4，加水定容至 100ml。

(2) 于 37℃用 2×SSC 清洗玻片 5min。

(3) 室温用 4×SSC+0.05% Tween-20 清洗玻片 5min。

(4) 室温下将玻片浸入 buffer 1，5min；10×buffer 1：8.76g NaCl，1.34g Tris 碱，14.04g Tris · Cl，调节 pH7.5，定容至 100ml。

(5) 37℃用 buffer 2 封闭玻片 30min；buffer 2：1g 脱脂奶粉溶于 100ml 1×buffer 1。

(6) 用 buffer 2 按 1∶500 稀释抗 DIG-AP(Roche)，玻片上加稀释的抗 DIG-AP，于湿盒中 37℃孵育 1.5h。

(7) 室温用 buffer 1 清洗玻片 15min，2 次。

(8) 室温用 buffer 3 平衡玻片 5min。

buffer 3：10ml 1mol/L Tris，pH9.5；10ml 1mol/L NaCl；加水至 100ml。

(9) 用 buffer 3 按 1∶50 稀释底物 NBT/BCIP(Roche)，每张玻片加 50μl 稀释的底物，于湿盒中 37℃孵育 5~10min，镜下观察显色结果满意后，将玻片置于 TE buffer(10ml 1mol/L Tris，pH8.0；2ml 0.5mol/L EDTA；加水至 1L)中 5min 终止反应。

(10) 按前述步骤将玻片逐级脱水后，空气中晾干，滴一滴二甲苯透明 10min，再滴一滴树胶(二甲苯稀释)封片，室温保存。

6.5.10 定性、定量研究

6.5.10.1 功能位点的确认与应用——点突变的研究方法

体内定点点突变是研究蛋白质结构功能关系和基因表达的一个重要技术，对某个已知基因的特定碱基进行定点改变、缺失或者插入，可以改变对应的氨基酸序列和蛋白质结构，对突变基因的表达产物进行研究有助于我们了解蛋白质结构和功能的关系，探讨

蛋白质的结构/结构域。早期的M13方法和常规的PCR方法，由于操作繁琐，意外突变多等缺陷，使定点突变的实验受到很大限制，现在实验中常用的是 Stratagene公司的Quik Change Site-directed Mutagenesis Kit。

1）操作步骤

(1) 准备突变的质粒从常规 *E.coli* 中经纯化试剂盒抽提质粒。

(2) 设计一对互补的、带有目标突变的引物，和模板质粒退火后用 PfuTurbo 聚合酶"循环延伸"。PfuTurbo 聚合酶在非链置换反应条件下使引物线性延伸，产生环状带缺刻的突变产物。

(3) *Dpn* I 酶切延伸产物，由于原来的模板质粒来源于常规大肠杆菌，是经 dam 甲基化修饰的，对 *Dpn* I 敏感而被切碎。

(4) 带突变序列的质粒由于没有甲基化而不被切开形成具缺刻的双链 DNA，将其转化至 XL-2 Blue 超级感受态细胞中，即可得到突变质粒的克隆。

2）注意事项

(1) 循环延伸是指聚合酶按照模板延伸引物，一圈后回到引物 5′端终止，再经过反复加热退火延伸的循环，这个反应区别于滚环扩增，不会形成多个串联拷贝。用的是低次数的循环延伸而非 PCR，有助于减少无意错配。只需要一次酶切和转化。

(2) *Dpn* I 识别序列为甲基化的 GATC，GATC 在几乎各种质粒中都会出现，而且不止一次。

6.5.10.2 磷酸化

蛋白质的磷酸化在细胞生长和分化的调控中扮演着重要的角色。靶蛋白的磷酸化程度由它们的蛋白质激酶和磷酸酶的相对活性决定。而且这两类酶的平衡受到许多因素影响，如生长因子、激素、细胞周期等。因此研究蛋白质磷酸化水平对于深入了解其所参与的信号转导过程是非常重要的。蛋白质磷酸化的定量测定常用 ^{32}P 来完成(斯佩科特等 2001)。

6.5.10.2.1 标记

1）所用设备与试剂

细胞培养瓶、液闪计数器、刮刷、低磷酸培养基(无放射性磷酸盐)、裂解缓冲液[20mmol/L Tris(pH7.5)]、2mmol/L EDTA 和 0.5% SDS、NP-40、DNase I。

2）操作步骤

(1) 用 60mm 或 100mm 培养瓶，在完全培养基中培养细胞至所希望的密度。

(2) 用预热的低磷酸培养基(无放射性磷酸盐)冲洗 2 次，然后加入含 0.5~1mCi ^{32}P/ml ($1\text{Ci} = 3.7\times10^{10}\text{Bq}$)的低磷酸培养基(50~100μmol/L 无机磷酸)。

(3) 培养结束后，回收 ^{32}P 标记培养基，用 10ml Aquasol(New England Nuclear)稀释，取一等份用液闪计数器测定 ^{32}P 活性。测定培养基中磷酸浓度，从这两个数据计算标记培养基中 ^{32}P 比活性。

(4) 用无二价离子的 PBS 清洗 ^{32}P 标记的细胞 2 次。每个 100mm 培养皿加 1ml 预热的裂解缓冲液在沸水浴中裂解细胞。用一次性细胞刮刷将细胞裂解物刮到一边，然后吸到 1.5ml 离心管，热水浴 10min。

(5) 冷却至室温。

(6) 离心留上清，加 NP-40 至 2%，加 $MgCl_2$ 至 5mmol/L。加无蛋白酶的 DNase I 与 RNase 各 0.1mg，室温放置 20min。

3) 注意事项

(1) 标准组织培养基有 1~2mmol/L 磷酸盐。为提高 ^{32}P 标记效率，通常将培养基中磷酸盐浓度降至 50μmol/L 或者更低。标记时间决定于胞内 ATP 库与培养基中 ^{32}P 比活性达到平衡的快慢。

(2) 对于长时间培养，为避免类似成纤维细胞这样的快速分裂细胞生长减慢，培养基中无机磷酸浓度应保持在 50~100mmol/L。

(3) 测定培养基中磷酸浓度时也可用高效液相层析从其他 ^{32}P 标记的分子中分离 ATP，直接测胞内[γ-^{32}P] ATP 的比活性。

(4) 2~4h 的短脉冲标记可以用来研究瞬时的蛋白质磷酸化。然而，在脉冲标记实验中，蛋白质 ^{32}P 标记的暂时提高，可能是磷酸化的提高，也可能因为磷酸转换增强，而蛋白质耦联的磷酸的量并没有改变。分别用含有或不含刺激物的样品，用双向凝胶电泳/Western 印迹比较未磷酸化蛋白质对磷酸化酸性同工型的比率，就可以区别以上两种可能性。

6.5.10.2.2 检测 ^{32}P 标记的蛋白质

放射性磷酸 ^{32}P 发出高能 β 粒子。因此，可以用 X 射线片放射自显影检测在单向或者双向凝胶上分辨出来的 ^{32}P 标记的蛋白质。

1) 所用设备与试剂

Whatman 3MM 滤纸、液闪计数器、胶片。

2) 操作步骤

(1) 单向或双向凝胶电泳分辨 ^{32}P 标记的样品。

(2) 在 Whatman 3MM 滤纸上吸干凝胶。用放射性墨水在凝胶边缘标几个点。

(3) 在完全黑暗或安全光下，在 X 射线片曝光夹里，将胶片放在凝胶与增感屏之间。确保胶片与凝胶增感屏的闪烁体面紧密接触。让凝胶与胶片夹在两块增感屏之间。用两块塑料板夹紧曝光夹，于−70℃曝光。

(4) 冲洗 X 射线片，显影。

(5) 依放射性记号，在读片机里将考马斯亮蓝染色胶与放射自显影图排列好，标出靶蛋白，拍照。

(6) 切下含靶蛋白的胶条，用液闪计数器检测磷酸化蛋白的放射性。

3) 注意事项

放射自显影光密度分析也可以测定蛋白质带的比活性。但是，基于放射自显影对放射性进行精确的定量，需要合适的曝光时间，而且受到胶片狭窄的线性反应期的限制。如果有 β-扫描仪，可以用磷光成像板对 ^{32}P 放射性进行定量测定。

6.5.11 蛋白质相互作用

基因是相对静态的，而基因编码的产物——蛋白质，则是动态的。具有时空性和可

调节性，是生物功能的主要体现者和执行者。在所有生命活动中，蛋白质的相互作用是必不可少的，它是细胞进行一切活动的基础。蛋白质的相互作用能产生许多效应，如可改变蛋白质动力学特性，形成特异底物作用通道，生成新的结合位点，使蛋白质失活，改变蛋白质对其作用底物的专一性等。了解蛋白质相互作用方式、作用程度、作用结果，将有助于干细胞研究中蛋白质功能的分析，干细胞扩增及分化过程中蛋白质变化等众多问题的解决。

6.5.11.1 GST 融合蛋白沉降技术

GST 融合蛋白沉降技术利用了 GST 对谷胱甘肽耦联球珠的亲和性，从非相互作用蛋白质的溶液中纯化相互作用蛋白质。GST 融合的蛋白质从细菌中表达和纯化，并平行制备细胞裂解液，再将 GST 融合蛋白质探针和细胞裂解液在谷胱甘肽琼脂糖球珠存在下混合并孵育，以使蛋白质结合。GST 融合探针蛋白和任何结合分子被离心收集，获得的混合物经洗涤后，用过量游离的谷胱甘肽洗脱或直接在 SDS-PAGE 上样缓冲液中煮沸。蛋白质经 SDS-PAGE 分离后进行下一步的 Western 印迹、放射自显影及蛋白质染色分析(黄培堂等 2003)。

1) 试剂与设备

(1) 缓冲液和溶液：

(2) 裂解缓冲液：

Tris · Cl (pH8.0)	20mmol/L
NaCl	200mmol/L
EDTA(pH8.0)	1mmol/L
Nonidet P40	0.5%(*m*/*V*)

使用前加入蛋白酶抑制剂，达到下述终浓度：2μg/μl 抑肽酶(aprotinin)、1μg/μl 白胃素(leupeptin)、0.7μg/μl 胃酶抑素(pepstatin)、25μg/μl 苯甲磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF)。

溶于 50mmol/L Tris · Cl (pH8.0)中的还原型谷胱甘肽(20mmol/L)。

(3) 2×SDS 凝胶上样缓冲液：

Tris · Cl(pH6.8)	100mmol/L
二硫苏糖醇(DDT)	200mmol/L
SDS (电泳级)	4%
溴酚蓝	0.2%
甘油	20%

不含 DDT 的 2×SDS 凝胶上样缓冲液可保存于室温，临用前必须从 1mol/L DDT 储存液现用现加入上述缓冲液中。

(4) GST 融合蛋白。

(5) 谷胱甘肽琼脂糖球珠。

(6) 沸水浴。

(7) 翻转样品旋转仪。

2) 实验步骤

(1) 将细胞裂解液与 50μl 的 50%谷胱甘肽琼脂糖球珠悬液和 25μg GST 在 4℃颠倒混合孵育 2h。

(2) 在微量离心机上以最大速度在 4℃离心混合物 2min。

(3) 将上清转移到新的离心管中。

(4) 设定两个含等量上清及 50μl 谷胱甘肽琼脂糖球珠的微量离心管。在一管中加约 10μg 的 GST 融合探针蛋白。两个反应中加入的探针和对照蛋白质的量应当是等摩尔的。将离心管在 4℃颠倒混合孵育 2h。

(5) 在微量离心机上以最大速度离心样品 2min。

(6) 在新的微量离心管中收集上清。这样样品可通过步骤(10)中的 SDS-PAGE 进行分析。

(7) 用 1ml 冰冷的裂解液洗涤球珠。在微量离心机上以最大速度离心 1min。弃去上清。重复洗 3 次。

(8) (可选)加入 50μl 20mmol/L 的还原型谷胱甘肽(在 50mmol/L Tris · Cl pH8.0 中)到球珠中，洗脱 GST 融合蛋白及任何与其结合的蛋白质。在微量离心机上以最大速度离心 2min。

(9) 将球珠[来自步骤(7)]或洗脱蛋白质[来自步骤(8)]与等体积 SDS-PAGE 上样缓冲液混合。

(10) 将样品煮沸 4min 并作 SDS-PAGE 分析。

3) 结果判定

检测与 GST 融合蛋白结合的蛋白质的方法取决于细胞裂解液是否被 ^{35}S 标记以及试验目的。如果目的是检测与融合蛋白结合的所有 ^{35}S 标记的蛋白质，就在干胶仪上将胶抽干，并用 X 射线片曝光进行放射自显影。如果目的是检测特异性结合的蛋白质，就将蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至膜上，进行免疫印迹分析。如果目的是确定与融合蛋白结合的蛋白质的大小和丰度，而这些蛋白质是来自非放射性的裂解液，就用考马斯亮蓝或硝酸银将胶染色。

6.5.11.2 免疫共沉淀

免疫共沉淀是以抗原和抗体之间的专一性作用为基础的研究蛋白质间相互作用的经典方法之一。在细胞的非变性条件下被裂解时，完整细胞内存在的许多蛋白质-蛋白质结合被保持下来。如果用蛋白质的抗体免疫沉淀该蛋白质，那么与该蛋白质在体内结合的另一蛋白质可能也沉淀下来。基于与蛋白质的生理性相互作用，蛋白质的免疫沉淀归类为免疫共沉淀。这种方法最常用于测定两种目标蛋白质是否在体内结合，但也可用于确定一种特定蛋白质的新的作用搭档。在保持蛋白质与蛋白质相互作用的条件下，收获和裂解细胞，从细胞提取液中特异性地免疫沉淀目的蛋白质，然后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离免疫沉淀物。该方法的优点是相互作用的蛋白质都是经过翻译后修饰的，处于天然状态，蛋白质相互作用可以在自然状态下进行，能避免人为的影响，分离到天然状态的相互作用蛋白质(Kay 2003)。

1) 试剂与仪器

(1) 缓冲液和溶液；

(2) EBC 裂解缓冲液：

Tris · Cl (pH8.0)	50mmol/L
NaCl	120 mmol/L
Nonidet P40	0.5%(*V/V*)
抑肽酶	10μg/μl
白胃素	5μg/μl
苯甲磺酰氟	50μg/μl
正钒酸钠	0.2mmol/L
氟化钠	100mmol/L

(3) NETN：

Tris · Cl (pH8.0)	20mmol/L
NaCl	100mmol/L
EDTA (pH8.0)	1mmol/L
Nonidet P40	0.5%(*V/V*)

(4) 磷酸缓冲液；

(5) 1×SDS 凝胶上样缓冲液；

(6) 三氟乙酸(TFA)(0.1%，*m/V*)；

(7) 胰蛋白酶：在 200mmol/L 碳酸氢铵(pH8.9)溶液中制备 250μg/ml 的牛胰蛋白酶；

(8) 胰蛋白酶消化缓冲液：0.02%(*V/V*)Tween-20、200mmol/L 碳酸氢铵(pH8.9)；

(9) 抗体；

(10) 蛋白质 A-Sepharose：在 NETN 缓冲液中制备 1∶1 悬浮的蛋白质 A-Sepharose；

(11) 电泳仪；

(12) 沸水浴；

(13) 摇床。

2) *方法*

(1) 用磷酸缓冲液冲洗 30 块 10cm 培养板上的适宜细胞(约 $6×10^7$ 个细胞)。刮去每板上的细胞到 1ml 冰冷的 EBC 裂解缓冲液中。

(2) 将每毫升细胞悬液转移至微量离心管中，在微量离心机上 4℃以最大速度离心 15min。

(3) 收集上清(约 30ml)并加入 30μg 的适当抗体，4℃摇动免疫沉淀物 1h。

(4) 加入 0.9ml 的蛋白质 A-Sepharose 悬液，4℃摇动免疫沉淀物 30min。

(5) 用含 900mmol/L NaCl 的 NETN 洗蛋白 A-Sepharose 混合物，再重复洗 5 次，最后用 NETN 洗 1 次。

(6) 吸出混合物的液体部分。加入 800μl 的 1×SDS 凝胶上样缓冲液，煮沸 4min。

(7) 将样品加入到大孔的不连续 SDS-PAGE 梯度胶中，在 10mA 的恒流下电泳过夜。

(8) 通过考马斯亮蓝染色观察蛋白电泳带。

(9) 从胶上切下目的带，将其放到微量离心管中，用 1ml 50%乙腈洗 2 次，每次 3min。

(10) 用胰蛋白酶消化胶中的蛋白质，再将酶解后的肽电洗脱。

a. 将胶条移到一个清洁的表面，让它不完全干。

b. 加 5μl 胰蛋白酶消化缓冲液和 2μl 胰蛋白酶溶液。

c. 在胶吸附胰蛋白酶溶液后，每次加 5μl 胰蛋白酶消化缓冲液，直到胶条恢复到最初的大小。

d. 将胶条置于微量离心管中，浸泡在胰蛋白酶消化缓冲液中，在 30℃孵育 4h。加入 1.5μl 的 0.1%三氟乙酸终止反应。

(11) 通过窄孔高效液相色谱分离肽。将收集的肽上样，进行自动降解测序。

3) 注意事项

(1) 每次的免疫沉淀需要 10^6~10^7 个细胞的提取物。

(2) 裂解细胞时，要事先确定有效溶解目的蛋白质的最温和裂解条件，以防破坏细胞内存在的蛋白质-蛋白质相互作用。

6.5.11.3 酵母双杂交

酵母双杂交系统最初是由 Fields 和 Sone 于 1989 年提出的，作用原理基于真核细胞转录因子的结构特性。这些转录因子通常由两个或两个以上相互独立的结构域组成，分别为 DNA 结合域(DB)和转录激活域(AD)，只有当两种结构域共同作用时，才能使转录正常进行，来自不同转录激活因子的两种结构域也能使转录正常进行。利用这种特性，可以使 DB 与 AD 同诱饵蛋白(X)和猎物蛋白(Y)形成融合蛋白，并在真核细胞中同时表达，如果两种蛋白质可以发生相互作用，就能使 DB 和 AD 在空间上充分接近，从而激活报道基因的转录(黄培堂等 2003)。

1) 试剂与仪器

(1) 缓冲液和溶液。

(2) 2×SDS 凝胶上样缓冲液：

Tris · Cl (pH6.8)	100mmol/L
二硫苏糖醇(DDT)	200mmol/L
SDS (电泳级)	4%
溴酚蓝	0.2%
甘油	20%

不含 DDT 的 2×SDS 凝胶上样缓冲液可保存于室温，临用前必须从 1mol/L DDT 储存液现用现加入上述缓冲液中。

(3) 二甲基亚砜(DMSO)。

(4) 乙醇。

(5) 冻存转化体用的无菌甘油溶液。

(6) 65%的无菌甘油。

(7) 1mol/L $MgSO_4$。

(8) 25mmol/L Tris · Cl(pH8.0)。

(9) TE(pH 7.5)(无菌)。

(10) TE(pH 7.5)含 0.1mol/L 乙酸锂(无菌)。

(11) TE(pH 7.5)含 40% PEG 4000 和 0.1mol/L 乙酸锂(无菌)。

(12) 乙酸铵(7.5mol/L)。

(13) 异丙醇。

(14) 裂解液：酶解酶 100T 以 2~5mg/ml 溶解于拯救缓冲液中，或 100 000单位/ml 的β-葡糖醛酸按 1∶50 稀释于拯救缓冲液中。每次使用均需配制新鲜的溶液。

(15) 拯救缓冲液：

Tris · Cl(pH 7.5)	50mmol/L
EDTA	10mmol/L
β-巯基乙醇	0.3%
SDS	10%(*m*/*V*)

(16) STES 裂解液：

NaCl	100mmol/L
Tris · Cl(pH8.0)	10mmol/L
EDTA	1mmol/L
SDS	0.1%(*m*/*V*)

(17) TE(pH8.0)。

(18) 凝胶。

(19) SDS 聚丙烯酰胺凝胶琼脂糖凝胶。

(20) 抗体：抗 LexA 的单克隆抗体或抗 LexA 的多克隆抗体或抗靶蛋白质融合域的特异性抗体。

(21) 培养基。

a. 完全基本酵母培养基

无氨基酸酵母氮源	6.7g
葡萄糖	20g
琼脂粉	20g
营养缺陷混合物	2g

加水至 1000ml。

b. 酵母 CM 选择性培养基。

c. 酵母选择性 X-gal 培养基：以 900ml 水制备基础培养基，将基础培养基高压灭菌冰冷却到 55℃。在另一个瓶子中，以 100ml 蒸馏水溶解 7g 磷酸氢二钠和 3g 磷酸二氢钠，然后高压灭菌。将两种高压灭菌的溶液混合在一起，并加入 0.8ml 浓度为 100mg/ml 的 X-gal，铺平板。

d. YPD 培养基

蛋白胨	20g
酵母提取物	10g
葡萄糖	20g
琼脂	20g(如果用于平板)

加 1L 蒸馏水并高压 20min。铺板前将高压灭菌的培养基冷却至 55℃。

(22) 载体和酵母。

2) *方法*

(1) 诱饵-LexA 融合蛋白的构建。

a. 将编码诱饵蛋白的靶 DNA 克隆到 LexA 融合载体的多聚接头处，以合成一种整合于编码框的 *LexA* 融合基因。确定诱饵序列的羧基端存在翻译终止序列。形成的质粒作为 pBait。

A. pBait + pMW112 (活化测定)
B. pSH17-4 + pMW112 (活化的阳性对照)
C. pRFHM1 + pMW112 (活化的阴性对照)
D. pBait + pJK101 (抑制/DNA 结合的测定)
E. pRFHM1 + pJK101 (抑制的阳性对照)
F. pJK101 (抑制的阴性对照)

b. 采用下列 *LexA* 融合基因和 lexAop-lacZ 报道质粒的组合，建立一系列 EGY48 lexAop-LEU2 选择的转化酵母菌。

c. 将每种转化混合物铺在适宜的选择性缺陷板上，将培养板在 37℃ 培养 2~3 天以选择含有质粒的转化酵母克隆。

d. 制备转化子的母板，可按(2)中步骤 a~e 描述的那样，对具有 lacZ 和 LEU2 报道子活化表型的特异性克隆进行分析。

(2) 活化和抑制活性的鉴定：lacZ 和 LEU2 表型的分析。

a. 从 A~F 的每个转化中，用无菌的平头牙签挑取 8 个克隆。用干净的牙签触及克隆以挑取细胞，使它们在新鲜的 CM(Glu)-Ura-His 或 CM(Glu)-Ura 板上的小格内成为 1cm 长的线。通常可在一个板上形成多达 60~80 条线。将平板在 30℃ 孵育过夜。

b. 第二天，从母板中再划线到下列每个板上：
转化 A~F：划线到 CM(Glu，X-gal)-Ura 和 CM(Gal，X-gal)-Ura 上。
转化 A~C：划线到 CM(Glu)-Ura-His-Leu 和 CM(Gal)-Ura-His-Leu 上。

c. 在 30℃ 将平板孵育到 4 天。

d. 对抑制和激活性进行分析：

i. 对于抑制活性，在划线接菌 12~24h 观察 X-gal 表型。

ii. 对于激活活性，在划线接菌 18~72h 观察 X-gal 表型。

iii. 在划线接菌 48~96h 观察 Lex2 表型。

e. 基于抑制和激活分析的结果，选择适当的候选克隆。

(3) 检测诱饵蛋白质的表达。

a. 在母板上，标记要分析蛋白质表达的克隆。用已证实适宜表达诱饵的克隆作为基础菌培养，供文库转化用。

b. 对每个新的诱饵构建，至少分析两个初级转化子。还要包括两个作为蛋白质表达阳性对照的转化子。

i. 用无菌牙签从 CM(Glu)-Ura-His 母板上挑取克隆，于 CM(Glu)-Ura-His 液体培养基中生长。

ii. 在滚筒或其他摇动仪器上 30℃ 培养过夜。

iii. 早晨，将达饱和的培养液稀释到含 3~5ml CM(Glu)-Ura-His 新培养管中，使初始密度 OD_{600} 约为 0.15。30℃培养 4~6h，直到光密度大约增大 2 倍。

c. 转移 1.5ml 培养液到一个微量离心管中，在离心机上以最大转速离心细胞 3~5min，可见沉淀的体积应为 2~5μl。小心倾去或吸去上清。

d. 加入 50μl 的 2×SDS 凝胶加样缓冲液到离心管中，快速振荡离心管以悬浮沉淀。立即将离心管放在干冰上或干冰/乙醇浴中。

e. 将样品从干冰或-70℃直接转到 100℃，并煮沸 5min。

f. 将样品在干冰上冷却并在离心机上以最大速度离心 5~30s，以沉淀大的细胞碎片。加 20~50μl 样品到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上。

g. 电泳并分析产物，以确定预期大小的诱饵蛋白是否以合理的水平表达。

(4) 筛选一个相互作用子。

a. 转化文库：

i. 挑选一个在前面步骤中的原始对照试验中状态最好的表达诱饵蛋白和 lexAop-lacZ 报道子的酵母菌落，接种于 20ml CM(Glu)-Ura-His 液体培养基中，30℃摇动过夜培养。

ii. 稀释 20ml 的过夜培养物于 300ml 的 CM(Glu)-Ura-His 液体培养液中，以使稀释后的培养液 OD_{600} 为 0.10~0.15。在摇床上 30℃过夜，直到该培养物增殖 1~5 倍，OD_{600} 为 0.50 左右。

iii. 把培养物转移至 1 个 250ml 的无菌离心瓶中，室温下 1000~1500*g* 离心 5min，移去上清，加入 30ml 无菌水，在工作台上轻轻拍打离心瓶重新悬浮沉淀，转移混合物到 1 个无菌 Falcon 管中。

iv. 1000~1500*g* 离心酵母 5min，倒掉上清，重新悬浮酵母细胞于 1.5ml 含 0.1mol/L 乙酸锂的 TE(pH 7.5)中。

v. 在 30 个 1.5ml 的无菌小离心管中分别加入 1μg 的 DNA 和 50μg 刚刚变性的载体 DNA。马上在每个小离心管中加入 50μl 的酵母悬浮液。

vi. 在每管细胞悬浮液中加入 300μl 含 40% PEG4000 和 0.1mol/L 乙酸锂的 TE (pH7.5)，轻轻翻转试管若干次使混合(不要振荡)，30℃培养 30~60min。

vii. 每个试管中加入 40μl DMSO，翻转混匀悬浮液，在 42℃的加热块上加热 10min。

viii. 按照下述步骤将转化混合物铺平板。其中的 28 管只用于产生转化子。①把每管中的混合物加到 24cm×24cm 的 CM(Glu)-Ura-His-Trp 选择平板上。②将细胞涂匀，并将平板置于 30℃孵育直到菌落出现。剩余 2 管用来评价转化效率。①从每个管中取 350μl 混合物加到 24cm×24cm 的 CM(Glu)-Ura-His-Trp 选择平板上。②铺平细胞，30℃孵育直到菌落出现。③取每管中剩余的 40μl 混合物用无菌的 TE (pH7.5)或水做一系列的 1∶10 稀释(至少 3 次)。④每份稀释液吸取 100μl 铺在 100mm CM(Glu)-Ura-His-Trp 选择平板上，30℃孵育直到菌落出现。

b. 初级转化子的收获和富集：

i. 收获文库：①分别在 5 个含有转化子的 24cm×24cm 的平板上倒入 10ml 无菌

水和大约30粒无菌玻璃珠。②把5个平板叠放在一起，紧握平板，猛烈地摇动平板直到菌落重新悬浮。③用无菌移液管从每个平板中吸取5ml酵母悬液。把细胞悬液集中在50ml的无菌锥形瓶中。④继续下面5个平板，重复①~③。连续从30个平板中收获酵母细胞，结果得到总体积为150ml的酵母悬液，保存在3个50ml的瓶中。

ii. 如果需要，在每个装有酵母细胞的锥形瓶中加无菌TE(pH7.5)或无菌水至40~45ml，振荡或翻转瓶中悬浮细胞。

iii. 使用台式离心机，室温、1000~1500*g* 离心5min，弃去上清。

iv. 重复ii和iii。

v. 重新悬浮压紧的细胞沉淀于1倍体积的无菌甘油溶液中，合并不同管的内容物，彻底混合。

vi. 分别转移1ml的细胞混合物于一系列无菌小离心管中，−70℃冻存。

c. 相互作用蛋白的筛选：

i. 解冻一份转化文库酵母细胞，用CM(Gal-Raff)-Ura-His-Trp 培养基按 1∶10 稀释，30℃摇动培养酵母细胞4h来诱导文库中GAL1启动子的转录。

ii. 在适当数量的100mm CM(Gal-Raff)-Ura-His-Trp-Leu dropout 平板上分别培养 10^6 个细胞。

iii. 30℃培养平板5天。

iv. 观察平板的生长，出现克隆时对其加以标记。

v. 第5天，涂布一个按每天出现的不同克隆分组的主平板CM(Gal-Raff)-Ura- His-Trp。

vi. 30℃孵育平板直到菌落出现。

d. 阳性相互作用的确定：β-半乳糖苷酶活性和亮氨酸需求的检测。

e. 测定转录活化：①使用一个平头牙签分别在下面的4个平板上复制和主平板上相同的栅格。使用相同的牙签在4个平板上划线培养单克隆，尽量在含有X-gal平板上划制粗的酵母线条，而在亮氨酸缺乏的平板上划细的酵母线条。②平板在30℃培养3~4天。

f. 解释结果。如果具备下面的条件，菌落和它们包含的质粒被认为第一轮的阳性克隆：在CM(Gal)-Ura-His-Trp平板上的培养物X-gal呈现蓝色；在CM(Glu)-Ura-His-Trp平板上的培养物X-gal分析呈现白色或仅是浅蓝色；菌落在CM(Gal-Raff)-Ura-His-Trp-Leu平板上生长良好；菌落在CM(Glu)-Ura-His-Trp-Leu平板上生长缓慢或根本不能生长。

6.5.11.4 噬菌体展示技术

噬菌体展示技术是将表达多肽的基因与噬菌体表面蛋白编码的基因融合，以融合蛋白的形式表达在噬菌体表面的一种方法，最常用的表达系统是M13噬菌体。将cDNA文库插入噬菌体载体进行表达后，所得到的总体为噬菌体展示库。为了得到与“诱饵”蛋白相作用的“猎物”蛋白，可将展示库与固定化的“诱饵”蛋白相互作用，则“猎物”蛋白被吸附下来，被吸附的重组噬菌体可经再感染而扩增，从而得到猎物蛋白的插入基因，目前，噬菌体展示技术可用于鉴定和分析与其他蛋白质相互作用的蛋白质的表面特

征；分离与特定氨基酸序列结合的新的配体；提高配体与靶结构之间相互作用的亲和力和特异性(Brymora 2004)。

在微量滴定板上进行亲和筛选的方法，是将标靶蛋白固定在微量滴定板上，噬菌体重组肽库加到板上来选择相互作用的蛋白质。淘选过程可以再重复2次，以富集可结合的噬菌体减少非特异性结合噬菌体的回收。经过3次的淘选，特异性连接的单克隆可通过ELISA进行检测。连接上的可以在加入辣根过氧化物酶标记的抗噬菌体单克隆抗体及显色底物后呈现颜色。

噬菌体表面呈现库的构建主要包括以下的步骤：

(1) 首先对要呈现的目的基因片段进行随机酶切，并对酶切片段进行回收；

(2) 酶切片段和克隆接头进行连接，并插入噬菌体载体；

(3) 重组的噬菌体转入合适的宿主菌建库；

(4) 转化菌培养扩增后提取重组的噬菌体。

6.5.11.4.1 试剂与仪器

(1) 0.2mol/L 碳酸氢盐缓冲液(Na_2HCO_3)，pH8.5；

(2) 封闭缓冲液：含有1%(*m/V*) BSA的PBS；

(3) 洗脱缓冲液：含有0.05%(*V/V*) Tween-20的PBS；

(4) 重组噬菌体展示库；

(5) 酸洗脱缓冲液：50mmol/L 甘氨酸-HCl，pH2.0；

(6) 中和缓冲液： 0.2mol/L Tris · Cl，pH7.5；

(7) 细菌：DH5α F′培养过夜；

(8) 2×YT 培养基以及顶层、底层琼脂：

胰蛋白胨	10g
酵母膏	10g
NaCl	5g

溶于1L的水中，高压灭菌。4℃储存2周；

(9) 底层琼脂：高压前加琼脂至终浓度为1.5% (*m/V*)；

(10) 顶层琼脂：高压前加琼脂至终浓度为0.8% (*m/V*)；

(11) 阴性对照蛋白；

(12) 辣根过氧化物酶标记的抗噬菌体M13的单克隆抗体；

(13) 显色底物；

(14) 96孔微量滴定板；

(15) 移液管；

(16) 5ml 无菌管；

(17) 无菌牙签；

(18) 能读取微量滴定板的分光光度计；

(19) DNA纯化测序设备。

6.5.11.4.2 方法

1) 微量滴定板包被

(1) 纯化的目的蛋白1~3μg加入0.5ml的0.2mol/L的碳酸盐缓冲液(pH8.5)中混合，

96孔板中每孔加150μl，在室温下静置孵育2h，少数蛋白质可以4℃过夜。

(2) 每孔加入200μl的封闭缓冲液室温孵育30min。

(3) 轻轻倒掉液体，在纸上轻叩两下，去除残留溶液。

(4) 每孔中加入200μl洗脱缓冲液，洗孔3次。

2) 选择相互作用的噬菌体

(1) 稀释重组噬菌体展示库，每150μl洗脱缓冲液含1000个噬菌体，之后取150μl加入到孔中，室温孵育2h。

(2) 轻轻倒掉液体，在纸上叩干，去除残留溶液。

(3) 加入200μl洗脱缓冲液，洗孔3次。

3) 结合噬菌体的回收

(1) 加入150μl酸洗脱液，洗脱，在室温放置10min，将3个孔的液体收集到一个干净的5ml的塑料管中，每孔含有10^3~10^8个噬菌体颗粒。噬菌体也可以用0.2mol/L乙醇胺(pH12.0)洗涤，然后中和。

(2) 加入200μl过夜培养的细菌，室温孵育10min。

(3) 加入3ml 2×YT顶层琼脂培养基，混匀，倒入100个15mm的含有2×YT底层琼脂培养基的培养皿中，在室温放置5min凝固，然后将板放于37℃孵育过夜。(除了用板扩大噬菌体外，还可在液体培养基中扩大。将感染后的细菌的溶液加入到5ml的2×YT的肉汤中，转移至50ml的管中，于37℃摇动过夜。)

(4) 往顶层琼脂上加入5ml洗脱缓冲液，用于洗提噬菌体颗粒，4℃静置过夜。

(5) 取500μl噬菌体悬液13 200r/min离心10min，将上清移入新管中，这样就得到了噬菌体。加400μl 20%(*m*/*V*)PEG/2.5mol/L NaCl到1.6ml的上清中，冰浴15min，迅速以13 200r/min离心5min，再用200μl洗脱缓冲液重悬。

(6) 重复上述过程，以获得大量的噬菌体。每个循环收集到的噬菌体滴度为1×10^{11} pfu/ml。

(7) 收集到的噬菌体在PBS中以1∶100稀释。在无菌的5ml的管中加入200μl过夜培养的DH5αF′，1~10μl稀释后的噬菌体，3ml的2×YT顶层琼脂培养，混匀。

(8) 将稀释的噬菌体接种在2×YT底层琼脂培养基上，37℃孵育过夜。

(9) 用无菌的牙签从噬菌斑挑取噬菌体，加入到含有50μl的过夜培养的DH5αF′及1ml 2×YT培养基中。37℃通风过夜培养生长。

4) ELISA测定

(1) 96孔板中一个孔用标靶蛋白包被，另一个用阴性对照蛋白包被，见“1)微量滴定板包被”的步骤(1)~(4)。注意设置足够的孔用于检测“3)结合噬菌体的回收”中的步骤(9)得到的克隆。

(2) 每对成对的孔中(目标与对照)加入100μl洗脱缓冲液和25μl的“3)结合噬菌体的回收”中的步骤(9)得到的单克隆噬菌体的上清，室温孵育2h。

(3) 轻轻倒掉液体，在纸上叩干，去除残留溶液。加入200μl洗脱缓冲液，洗孔3次。

(4) 每孔加100μl的抗噬菌体单克隆抗体(连有辣根过氧化物酶)，以1∶5000的比例稀释，室温孵育1h。

(5) 轻轻倒掉液体，在纸上叩干，去除残留溶液。加入 200μl 洗脱缓冲液，洗孔 3 次。

(6) 每孔加入 100μl 的显色底物，孵育 30min。

(7) 405nm 处测量光密度值。

5) 确定相互作用的噬菌体序列

(1) 插入到重组噬菌体中的 DNA 纯化及测序。

(2) 将编码序列转化为肽序列。

噬菌体展示可用于：①鉴定和分析与其他蛋白质相互作用的蛋白质的表面特征；②分离与特定氨基酸序列结合的新配体；③提高配体与靶结构之间相互作用的亲和力和特异性。

6.5.12 蛋白质结构

蛋白质有成千上万种，不同的蛋白质具有不同的生物功能，生物功能的多样性是由蛋白质结构多样性所决定的。因此，蛋白质结构的研究占相当重要的地位。

6.5.12.1 蛋白质一级结构的测定方法

蛋白质一级结构的测定有助于研究蛋白质的立体结构和蛋白质的功能，了解物种分子进化及鉴定分子病等。

1) 蛋白质样品的纯化

蛋白质样品与等体积 SDS-PAGE 上样缓冲液混合。将样品煮沸 4min 后进行 SDS-PAGE 电泳。

2) 测定蛋白质分子中的多肽链的数目

通过测定蛋白质分子中 N 端和 C 端残基的摩尔数及蛋白质的相对分子质量，可以确定蛋白质分子中肽链的数目，但应注意可能有封闭的末端，如乙酰化的 N 端和酰胺化 C 端等。

3) 多肽链的分离

在测定一个蛋白质的结构以前，首先必须保证被测蛋白质的纯度，使结果准确可靠。其次要了解它的分子质量和亚基数，按照其亚基数将蛋白质分成几个多肽链。

(1) 肽链的拆开。蛋白质分子多肽链的连接有共价结合和非共价结合两种。要拆开以共价结合的—S—S—连接的多肽链，必须采用的化学处理方法有：

a. 过甲酸氧化：用氧化剂过甲酸断裂—S—S—。这个反应一般在 0℃下进行 2h 左右，2 个 S 就全部能转变成磺酸基，这样被氧化的半胱氨酸称为磺基丙氨酸。如果蛋白质分子中同时存在半胱胺酸，那么也会被氧化成磺基丙氨酸。此外甲硫氨酸和色氨酸也可被氧化，从而增加分析的复杂性。

b. 巯基乙醇还原：利用还原剂巯基乙醇亦可使蛋白质的—S—S—断裂。当高浓度的巯基乙醇在 pH8.0 条件下室温保温几小时后，可以使—S—S—定量还原。与此同时反应系统中还需要有 8mol/L 脲或 6mol/L 盐酸胍使蛋白质变性，多肽链松散成为无规则的构型，此时还原剂就可作用于—S—S—。此反应是可逆的，

因此要使反应完全，巯基乙醇的浓度必须在 0.1~0.5mol/L。

c. Cleland 试剂的还原作用 Cleland 指出二硫赤藓糖醇(dithioerythritol)及二硫苏糖醇(dithiothreitol)在氧化还原能力上是比较强的试剂，只要 0.01mol/L 就能使蛋白质的—S—S—还原，反应基本与巯基乙醇相似，且在许多球蛋白反应中，可以不用变性剂。Cleland 试剂首先与蛋白质—S—S—形成中间物，反应终了，还原剂被氧化形成一个稳定的六环化合物，蛋白质则被还原。蛋白质分子的几条肽链若以非共价键结合，则用尿素、盐酸胍等变性剂即可拆开。

(2) 蛋白质的多肽链被拆开后，将它分离纯化，一般多用凝胶过滤、离子交换、电泳等方法。

4) 测定多肽链的氨基酸组成

(1) 代测蛋白质与 5.7mmol/L 的盐酸在水解管中混合。并加入苯酚以防半胱氨酸和甲硫氨酸氧化，抽去空气，充满氮气，110℃水解 24h，或在 150℃下快速水解 90min。

(2) 水解得到的氨基酸与化学试剂反应，产生易被检测的氨基酸衍生物。氨基酸与茚三酮反应生成紫色化合物，在 570nm 处有吸收峰。脯氨酸和羟脯氨酸与茚三酮反应生成黄色化合物。

(3) 分离及检测。酸性条件下氨基酸带正电荷，是阳离子。在通过阳离子交换树脂时被吸附到柱上，再用洗脱液洗脱、收集。

5) N 端和 C 端氨基酸残基的测定

N 端分析：①多肽的α-氨基与异硫氰酸苯酯(PITC)试剂耦联；②在无水条件下用三氟乙酸酸裂解，形成 ATZ-氨基酸；③ATZ-氨基酸在三氟乙酸水溶液(25%)中转化成稳定的 PTH-氨基酸；④通过薄层层析、气相色谱、高效液相谱及质谱进行氨基酸的鉴定。C 端分析：C 端自由羧基与乙酸酐反应生成混合酸酐，并进一步环化成噁唑酮，C 端噁唑酮在硫氰四丁胺的作用下，转化为乙内酰硫脲(TH)。

(1) N 端测定：

a. 二硝基氟苯法(FDNB、DNFB)：DNP-氨基酸用有机溶剂抽提后，通过层析位置可鉴定它是何种氨基酸。Sanger 用此方法测定了胰岛素的 N 端分别为甘氨酸及苯丙氨酸。

b. 氰酸盐法。

c. 二甲基氨基萘磺酰氯法。

(2) C 端分析：

a. 肼解法：这是测定 C 端最常用的方法。将多肽溶于无水肼中，100℃下进行反应，结果羧基末端氨基酸以游离氨基酸状释放，而其余肽链部分与肼生成氨基酸肼。这样羧基末端氨基酸可以采用抽提或离子交换层析的方法将其分出而进行分析。如果羧基末端氨基酸侧链是带有酰胺如天冬酰胺和谷氨酰胺，则肼解时不能产生游离的羧基末端氨基酸。此外肼解时注意避免任何少量的水解，以免释出的氨基酸混淆末端分析。

b. 羧肽酶水解法：羧肽酶可以专一性水解羧基末端氨基酸。根据酶解的专一性不同，可区分为羧肽酶 A、B 和 C。应用羧肽酶测定末端时，需要事先进行酶的动力学实验，以便选择合适的酶浓度及反应时间，使释放出的氨基酸主要是 C

端氨基酸。

6) 肽段的氨基酸序列分析

Edman 降解的最大优越性是在水解除去末端标记的氨基酸残基时，不会破坏余下的多肽链。

(1) 用苯异硫氰酸酯(PITC)在 pH9.0 的碱性条件下对蛋白质或多肽进行处理，PITC 与肽链的 N 端的氨基酸残基反应，形成苯氨基硫甲酰(PTC)衍生物，即 PTC 肽。

(2) PTC-肽用三氟乙酸处理，N 端氨基酸残基肽键被有选择地切断，释放出该氨基酸残基的噻唑啉酮苯胺衍生物。

(3) 将该衍生物用有机溶剂(如氯丁烷)从反应液中萃取出来，而去掉了一个 N 端氨基酸残基的肽仍留在溶液中。萃取出来的噻唑啉酮苯胺衍生物不稳定，经酸作用，再进一步环化，形成一个稳定的苯乙内酰硫脲(PTH)衍生物，即 PTH-氨基酸。留在溶液中的减少了一个氨基酸残基的肽再重复进行上述反应过程，整个测序过程现在都是通过测序仪自动进行。每一循环都获得一个 PTH-氨基酸，经 HPLC 可以鉴定出是哪一种氨基酸。当蛋白质中含有一个或多个半胱氨酸残基时，有时一对半胱氨酸残基会通过二硫键交联。在这种情况下测序，首先要经过处理(如用过甲酸处理)切断二硫键，然后再进行 Edman 降解测。

7) 重叠法确定肽链的一级结构

8) 蛋白质分子中二硫键及酰胺键的确定和磷酸化、糖基化修饰点的定位

(1) 蛋白质分子中二硫键的定位。

a. 蛋白质中由二硫键相连的肽链拆分：

i. 过甲酸处理：蛋白质中带游离巯基的半胱氨酸残基及由二硫键连接的半胱氨酸残基可被过甲酸氧化成黄基丙氨酸残基，将肽链拆分。

ii. 巯基乙醇或二巯基苏糖醇处理：用巯基乙醇或二巯基苏糖醇还原二硫键，再用碘乙酸烷基化，然后分别测定拆分得到的多肽链的一级结构。

b. 酶水解肽链未拆分的蛋白质，找出其中含有二硫键的肽段：蛋白质在微酸环境中进行(pH2.0~6.5)。将肽段样品点样在正方形滤纸一角，第一方向碘用分离后，用过甲酸蒸气处理滤纸，然后滤纸旋转 90°，在与第一方向电泳的条件下进行第二方向电泳。由于两次电泳条件相同，不含二硫键的肽段在两次电泳中迁移率相同，最终聚集在正方形滤纸的对角线上。含有二硫键的肽段，在过甲酸处理后产生两个负电性增强的肽段，第二次电泳迁移率与第一次不同，不聚集在对角线上，据此可以加以区分。

(2) 酰胺基的定位。蛋白质的氨基酸组成分析可测定蛋白质中酰胺氮总量。

(3) 磷酸化修饰定位。用 ESI 质谱法或 MALDI 质谱法比较磷酸化前、后肽段的质谱可以定位磷酸化的位点。

(4) 糖基化位点的确定。肽段中糖计划修饰有两种类型，*N*-糖基化发生在门冬酰胺的侧链 N 原子上，*O*-糖基化发生在丝、苏氨酸侧链羟基的 O 原子上，比较用糖苷酶水解前、后糖肽的 MALDI 质谱便可以确定修饰位点(鲁子贤 1982)。

6.5.12.2 蛋白质二级结构的测定

1) 圆二色谱分析

圆二色谱分析是检测蛋白质二级结构信息的一种有用的方法。不同的二级结构对应与左旋光和右旋光的光吸收差值。通过分析圆二色谱曲线，可以估计二级结构螺旋、折叠以及无规则卷曲的比值。

样品的处理：ResourseQ 和 ResourseS 离子交换柱分离的样品，低温中速离心浓缩至 0.2mg/ml，并将缓冲液换至测量缓冲液(浓度为 50mmol/L Tris、50mmol/L NaCl、5mmol/L $MgCl_2$、pH7.5 的缓冲液中含 0.2mg/ml)中，直接用于测量。测量杯长度为 0.2cm，溶液体积 100μl。波长频率范围是 190~250nm。测量温度为 25℃。

2) 动态光散射分析

动态光散射仪(dynamic light scattering)分析，在 Protein Solution 公司的 Dyna Pro 仪器上运行。

样品处理： ResourseQ 和 ResourseS 离子交换柱分离的样品，低温中速离心浓缩至 0.2mg/ml，并将缓冲液换至测量缓冲液(浓度为 50mmol/L Tris、50mmol/L NaCl、5mmol/L $MgCl_2$、pH7.5 的缓冲液中含 0.2mg/ml 样品)中，取 20μl 蛋白质样品，12 000r/min 高速离心 10min 后，用于测量。在 20 次的测量后，计算出溶液状态中的蛋白质的分子半径、分子质量以及主要的颗粒。测量温度为 25℃(Wei 1996)。

6.5.12.3 蛋白质晶体空间结构

X 射线衍射法分析蛋白质的晶体空间结构。

1) 材料与仪器

RIGUKU 转靶阳极 X 射线发生器安低温液氮控制系统、衍射数据收集的面探测仪、X 射线单色器。

2) 方法

X 射线晶体学研究通常采用的 X 射线波长与化学键键长相当，也与晶体内的原子间距离响应，约为 0.1nm。一个晶体包括上亿个有序排列的基本单元。在晶胞中，原子核外电子组成的电子云对 X 射线产生衍射，由于晶体的周期性衍射束只在特定方向出现，电子云可以用傅里叶级数展开，其中每一项的大小与衍射强度相对应，可直接测量，而每一项的相位目前尚没有成熟的方法直接进行测量(牛立文 1998)。

(1) 结晶：需要通过大量的条件筛选和优化以恰好是蛋白质分子间的相互作用促成蛋白质分子形成高度有序的晶体，而不是随机聚合形成沉淀。这就要求溶液中的蛋白质处于合适的过饱和状态，并只形成少数的成核中心，使晶体能持续地慢慢生长成大单晶。

(2) 数据收集：通常利用(单波长)X 射线光束照射在一定角度范围内旋转的蛋白质晶体，同时记录晶体对 X 射线散射的强度。这些强度可转换为结构测定中的结构因子的振幅。

(3) 相角的测定：结构因子的振幅及相角不是直接相关的量。由于结构因子相角的全部信息在收集数据时丢失，因此必须通过其他途径来得到它们的数值。

(4) 相角的改进(优化)：电子密度图的质量及其后的可解释性主要取决于相角的准确性。有的情况下采用晶胞中不对称单元中的等同部分的电子密度平均，有可能大大地改善误差较大的起始相角。

(5) 电子密度图的解释：相位确定后，可开始计算电子密度图。若从电子密度图能跟踪出肽链走向和分辨出二级结构，则可能推出多肽链的三维折叠方式。进而根据氨基酸序列，就可能构建出原子坐标形式的蛋白质结构模型。

(6) 修正：考虑到以建立的立体化学资料的限制，根据 X 衍射数据对初始的蛋白质分子模型进行修正(Kensal 1998)。

6.5.12.4 常用蛋白质序列和结构数据库

PDB：蛋白质三维结构，http://www.rcsb.org/pdb

SWISS-PROT：蛋白质序列数据库，http://kr.expasy.org/sprot/

PIR：蛋白质序列数据库，http://pir.georgetown.edu/

OWL：非冗余蛋白质序列，http://www.bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/OWL/

EMBL：核酸序列数据库，http://www.embl-heidelberg.de/

TrEMBL：EMBL 的翻译数据库，http://kr.expasy.org/sprot/

GenBank：核酸序列数据库，http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/

PROSITE：蛋白质功能位点，http://kr.expasy.org/prosite/

SWISS-MODEL：从序列模建结构，http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html

SWISS-3DIMAGE：三维结构图示，http://us.expasy.org/sw3d/

DSSP：蛋白质二级结构参数，http://www.cmbi.kun.nl/gv/dssp/

FSSP：已知空间结构的蛋白质家族，http://www.bioinfo.biocenter.helsinki.fi

SCOP：蛋白质分类数据库，http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/

CATH：蛋白质分类数据库，http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath/

Pfam：蛋白质家族和结构域，http://pfam.wustl.edu/

6.5.13 信号通路的描绘——激动剂、抑制剂的使用

多能干细胞的多向分化途径是有不同的基因调控所决定的，相应基因的表达是因为体内外不同的诱导剂所及获的，不同的生长因子或细胞因子对干细胞的增殖及分化起着不同的作用，因此干细胞在感知这些外源因素后，实际经过了信号跨膜，内转导途径激活，核转录因子激活，基因的不同表达，蛋白质合成，细胞代谢、功能、形态变化这一复杂的级联反应过程。目前关于干细胞增殖、分化的分子机制尚不明确，而细胞感应外源刺激信号，启动并实现信号的跨膜转导，激活信号的胞内传导过程是细胞实现增殖分化的前提。了解细胞分化的信号转导途径对于更进一步阐明其基因调控机制，通过促进信号转导途径促进细胞的定向分化有着重要意义(孙大业等 2001)。

(1) 干细胞分化的正向信号转导通路的测定。使用诱导基诱导干细胞定向分化，在不同诱导时间测定某一信号传导通路中信号转导蛋白的变化，比较结果，随着诱导时相

的延长，蛋白质含量逐渐增高组初步确定为正相信号转导通路。

(2) 反向抑制信号转导通路，分析蛋白质含量变化与基因表达之间的关系，进一步确定正相信号转导通路。在诱导基诱导干细胞分化过程中，假如初步选定的正向信号通路的特异抑制剂，观察在信号转导通路抑制后，蛋白质含量变化情况(Yamada 1999)。

方法：将细胞信号通路的抑制剂或激活剂加入诱导体系中，使用免疫组化、免疫细胞化学、Western 印迹、RT-PCR 等实验技术来检测细胞的分化过程中的信号通路是否被抑制或是激活。表 6.1 和表 6.2 列出了一些信号通路研究中常用的抑制剂和激活剂以及它们的适用范围。

表 6.1 信号通路研究中的常用抑制剂

抑制剂名称	用途	抑制剂名称	用途
BAY 11-7082	IκBα 抑制剂	cyclosporin A	PP2B 抑制剂
H-89	PKA 抑制剂	Forskolin	腺苷酸环化酶抑制剂
helenalin	NF-κB 抑制剂	LY-294002	PI 3-kinase 抑制剂
lactacystin	NF-κB 抑制剂	Okadaic acid, sodium salt	蛋白磷酸激酶抑制剂
PD-98059	MEK1, 2 抑制剂	PMA	PKC 激动剂
rapamycin	免疫抑制剂	SB-202190	SB-202190
SB-203580	p38 MAPK 抑制剂	SP600125	JNK1,2,3 抑制剂
staurosporine	蛋白激酶、酪氨酸激酶和磷酸化酶激酶抑制剂	triciribine	Akt 抑制剂
Akt 抑制剂	MEK1,2 抑制剂	wortmannin	PI 3-kinase 抑制剂

表 6.2 MAPK 信号通路研究相关的激活剂

名称	说明
anisomycin, streptomycete, griseolutein	高效的激活哺乳动物细胞 JNK/SAPK 和 p38 MAPK 激活剂；作为有效信号激活剂与生长因子一起协同诱导 c-Fos 和 c-Jun；抑制翻译过程中的蛋白质合成；诱导 U937 细胞(人组织淋巴瘤细胞系)凋亡
aurintricarboxylic acid	抑制多种因子造成的不同类型细胞凋亡；DNA 拓扑异构酶 II 的有效抑制剂；促进 MAPK、Shc 蛋白、PI 3 激酶和 PLC-g 的酪氨酸磷酸化；有效抑制血管生成，增加 angiostatic steroid 活性；并可抑制 calpain 的两种亚型(m-calpain $IC50 = 22$mm, m-calpain $IC50 = 10$)
palytoxin(palythoa toxica)	源于海葵的非蛋白质毒素，皮摩尔级浓度的分子即可损伤细胞；对可兴奋细胞和非兴奋细胞均可产生多重效应；在 Swiss 3T3 纤维原细胞中激活 SAPK/JNK 通路；去极化心脏及平滑肌的兴奋细胞，增加胞内 Ca^{2+}浓度；与钠、钾泵结合从而抑制 Na^+、K^+-ATP 酶活性，促进 K^+外流；也是阳离子载体和非 TPA 肿瘤促进因子
D-erythro-sphingosine *N*-acetyl	具生物活性和细胞渗透性的非生理性神经酰胺类似物；抑制 HL-60 细胞生长、诱导凋亡；促进核小体 DNA 降解；激活 HL-60 人早幼粒细胞的 SAPK；异三聚体 PP2A 的激活剂；浓度为 100nmol/L 时激活 T9 细胞中的胞质 Ser/Thr 蛋白磷酸酶
D-erythro-sphingosine *N*-hexanoyl	具生物活性和细胞渗透性的非生理性神经酰胺类似物；诱导细胞周期阻滞；活化 MAPK；浓度为 10nmol/L 时激活 PP2A；抑制纤维原细胞中甘油二酯累积，抑制磷脂酶 D 的活性；诱导 Molt-4 白血病细胞凋亡并增强 angiostatic steroid 活性
D-erythro-sphingosine *N*-octanoyl	内源神经酰胺的类似物，为具细胞渗透性的短链；可诱导多种细胞系凋亡；在 HL-60 细胞系中激活 MAPK

续表

名称	说明
sphingosylphos, phoryl-choline	去乙酰基鞘磷脂衍生物，已知在神经性 A 型尼曼匹克症(niemann-pick)中累积；在 Swiss 3T3 细胞系中快速诱导 p125FAK 和桩蛋白的酪氨酸磷酸化并导致 MAPK 短暂活化；促进细胞分裂，通过部分非 PKC 依赖的路径增加细胞内游离 Ca^{2+}浓度和花生四烯酸含量
tumor necrosis factor-α	通过与白细胞分叶核、T 细胞、产生抗体的 B 淋巴细胞、纤维原细胞以及骨髓造血细胞相互作用激活多种免疫反应机制；其活力没有种属特异性；激发 SAP 激酶活性；诱导人中性粒细胞以及内皮细胞的凋亡；提高血管平滑肌中的 iNOS 浓度水平；参与一些急、慢性疾病的病理过程

6.5.14 染色体、转录调控

新基因分离后，最重要的任务就是阐明其所编码的蛋白质的结构、生化活性以及生物学功能。另外还要研究调控一种细胞内和不同细胞类型及组织中蛋白质生化活性的机制。我们可以通过翻译后修饰、与其他蛋白质或配体的相互作用、调节蛋白质稳定性来研究蛋白质的生化活性。还可以通过调节转录起始速度、转录延伸速度、mRNA 转移和翻译速度使蛋白质生化活性在基因表达水平受到调控。

要严密进行基本的转录调控分析，推荐采用的策略是首先鉴定重要的调控区，如启动子、增强子、沉默子，后者是远距离调控区。然后，采用综合性突变分析技术分析相关的 DNA 序列，鉴定与元件相互作用的因子，克隆编码这些因子的基因及证明这些因子确实能够调控基因(陈小红等 2002)。

6.5.14.1 转录起始位点的定位

可以通过定位转录起始位点来确定启动子区域的位置。引物延伸、RNase 保护、S1 核酸酶分析和 cDNA 末端的快速扩增势确定转录起始位点的最常用技术。

1) *引物延伸是从引物 5′端的 ^{32}P 标记开始*

引物通常是人工合成的寡核苷酸，与预计起始位点 5′端下游 50~150 个核苷酸的 mRNA 序列互补。在根据经验确定的反应条件下，过量的放射性标记引物与总 RNA 中特异的 RNA 分子，或从目的细胞中分离、经寡聚 dT 纯化的 mRNA 退火。将逆转录酶、脱氧核苷三磷酸和适宜的缓冲液加到引物-mRNA 杂交分子体系中，催化引物延伸到 mRNA 的 5′端。用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析产生的放射性标记的 cDNA 产物。通过与旁边的标准分子质量比较，在凝胶中检测条带的相对分子质量大小。然后计算从合成的寡核苷酸 5′端到 mRNA 转录起始位点的距离。

2) *RNase 保护*

从掺入(α-^{32}P)NTP，通常是(α-^{32}P)UTP，制备均匀标记的 RNA 探针开始。用噬菌体 RNA 聚合酶(SP6、T7、T3)合成 RNA 探针，从插入普通质粒载体的特异性噬菌体启动子初开始转录。要进行起始位点定位，质粒模板应包含目的基因转录起始位点在内的基因组 DNA 片段。将这个基因组片段反向亚克隆到质粒中噬菌体启动子下游，以使 RNA 探针的部分 5′端能与目的 mRNA 互补。也可以采用 PCR 产生用于制备探针的 DNA 模板，

其中一个 PCR 引物应含有噬菌体聚合酶启动子序列，然后扩增基因组序列。放射性标记的探针与从目的细胞中纯化的细胞质 mRNA 或总 mRNA 退火，杂交反应在甲酰胺缓冲溶液中进行数小时或过夜。然后将 RNase A 或 RNase T1 加到杂交反应体系中，这些核酸酶消化 RNA 分子上的单链突出部分，而 RNA-RNA 杂交分子抗消化。这种抗性是该方法的理论基础，因为与特异性 mRNA 分子退火的探针区域抗消化。探针抗性区域的长度将与探针 5′端到转录起始位点的长度相等。由于该探针是放射性标记的，可以在高分辨的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上观察抗性片段的大小。

3) S1 核酸酶保护

其实验程序与 RNase 保护程序相似，只是放射性标记探针通常是单链或双链的 DNA 分子，而不是 RNA 分子。

4) cDNA 末端快速扩增

开始于引物延伸步骤。将寡核苷酸引物与目的 mRNA 前 100 或 200 个核苷酸复性，利用逆转录酶将之延伸到 mRNA 5′端(引物不被放射性标记)。然后利用 PCR 扩增 3′端与转录起始位点相关的 cDNA 产物。由于 3′端不确定，PCR 程序中必须增加一个新步骤，包括将 cDNA 3′端延伸，将产生的短已知序列片段作为 PCR 引物结合位点，用 RNA 连接酶将单链寡核苷酸连接到 3′端，或利用末端转移酶添加同聚序列。利用与延伸序列互补的引物以及最初 cDNA 合成步骤中利用的引物内部的另一个引物，扩增 cDNA 片段。扩增产物插入到载体中。分离多个单质粒克隆，并测定每个克隆的序列。通过对 PCR 混合物的许多克隆测序，可以推测 RNA 起始位点的位置(Frohman 1995)。

6.5.14.2 启动子的功能性分析方法

分析基因转录调控机制的关键是确立一种检测相关顺式作用调控区活性的分析方法。有了合适的功能性分析方法，就可以评价鉴定重要的调控元件，最终达到鉴定重要转录因子的目的。目前，用于研究转录调控的功能性分析方法，最常用的是瞬时转染分析法。该方法是通过一定转染程序将含目的调控区的质粒导入培养细胞。典型情况下，调控区调控报道基因的转录。如目的调控区是一个启动子，且置于紧靠报道基因的上游，则这种启动子就能驱动报道基因转录。如目的调控区是在启动子的远距离处起作用的增强子或其他调控区，分析较透彻的启动子通常位于报道基因的上游，而增强子插入到启动子上游或报道基因下游。此方法通常用于对顺式作用 DNA 序列和调控基因表达的反式因子进行初步分析。

6.5.14.3 远距离调控区的鉴定和分析

启动子在与转录因子和 RNA 聚合酶结合前，高度有序的染色质结构必须加以改变。远距离调控区可能通过影响染色质结构参与调控基因座的可结合性。因此，远距离调控区在调控链中可能位于启动子的上游。远距离调控区包括增强子、沉默子、基因座控制区(LCR)、绝缘子和基质附着区(MAR)。核酸酶超敏感性分析法是定位远距离调控区相对快速的方法。鉴定了核酸酶超敏感区域之后，就要分析确定该区域的功能相关性(Carey et al. 2000)。

此外还有鉴定调控区中的顺式作用DNA元件以及DNA结合蛋白的鉴定及其基因的

分离，来分析干细胞中基因的转录调控机制。

(师　伟　韩　姝)

6.6　干细胞增殖分化调控研究范例 I——由生命现象到功能分子

CD34 分子是公认的造血干细胞阳性标志，此外，不表达造血细胞各分化系表面标志的细胞也是分化上更为原始的细胞，即 Lin^-细胞。目前临床和基础研究中分离造血干细胞的方法都是针对 CD34 分子来进行的。然而，动物体内的造血重建实验证实，不论是小鼠还是人在 Lin^-CD34^-细胞群中都含有具有自我更新和多系分化能力的造血干细胞，而且在造血细胞发育过程中 Lin^-CD34^-细胞比 Lin^-CD34^+细胞更原始，因此 Lin^-CD34^+细胞很可能是由 Lin^-CD34^-细胞发育而来的。进一步研究还发现 Lin^-CD34^-造血干细胞在重建造血、增殖潜能、转染能力方面都优于 Lin^-CD34^+造血干/祖细胞。通过对 Lin^-CD34^-和 Lin^-CD34^+这两群非常相近的细胞的基因表达情况进行比较，找出 Lin^-CD34^-细胞特异表达的、可能与其性状相关的基因，将为其临床应用提供理论依据。

根据已知的现象差异，王冬梅等人采用抑制消减杂交的方法建立了 Lin^-CD34^-细胞与 Lin^-CD34^+细胞的 cDNA 消减文库，从中找出了 Lin^-CD34^-细胞特异表达的、可能与其性状相关的基因(王冬梅 2003)。

6.6.1　实验原理

抑制消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)通过寻找差异表达的基因以实现对功能、表型差异的机制分析(Diatchenko et al. 1996)。SSH 是一种以抑制性 PCR 反应为基础的新型 cDNA 消减杂交方法。将两种含有末端重复序列的不同接头分别连接于等量的两份待消减实验方(tester)cDNA 的末端，并将两者同过量的消减用的驱动方(driver)cDNA 进行杂交，第一轮杂交后将两份杂交产物合并进行第二轮杂交，最后以杂交产物作为模板进行 PCR 扩增，扩增产物即为差异表达 cDNA 片段。特殊设计的引物能抑制同一份样品内自身退火的 cDNA 片段的扩增，即所谓的抑制性 PCR 技术，它可以选择性扩增差异表达的目的 cDNA 片段，而抑制非差异片段的扩增(图 6.5)。

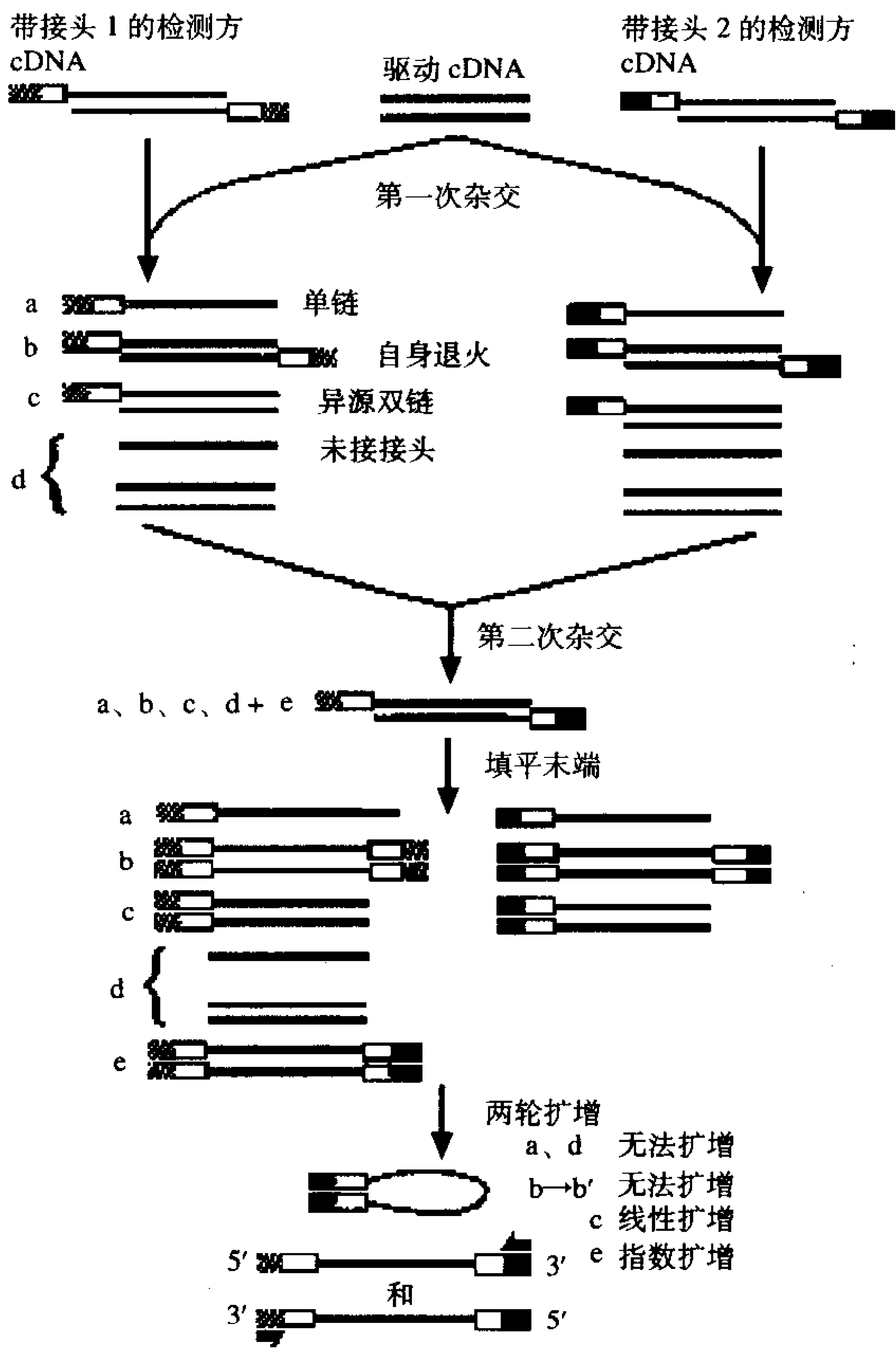


图 6.5　抑制消减杂交原理

6.6.2 主要设备与试剂

PCR 仪、Trizol®试剂盒(Gibco BRL)、SMART™ PCR cDNA 合成试剂盒(Clontech)、PCR 纯化试剂盒(Promega)、PCR-Select™ cDNA 消减试剂盒(Clontech)、DNA 快速纯化回收试剂盒(博大泰克)、pGEM®-T Easy Vector System(Promega)。

6.6.3 实验步骤

6.6.3.1 两种细胞总 RNA 的提取(参见 6.4，细胞组分的提取)

6.6.3.2 SMART PCR 合成并扩增双链 cDNA

6.6.3.2.1 第一链 cDNA 合成

将以下试剂混合在一个 PCR 管中：

RNA(1μg)	2μl
cDNA 合成引物(10μmol/L)	1μl
SMART II 寡核苷酸(10μmol/L)	1μl
去离子水	1μl
总体积	5μl

涡旋混匀并短暂离心，置 PCR 仪中，70℃、2min，短暂离心使样品沉在管底，然后加入以下试剂：

5×第一链 buffer	2μl
DTT(20mmol/L)	1μl
50×dNTP(10mmol/L)	1μl
SuperScript II 逆转录酶(200U/μl)	1μl

涡旋混匀并短暂离心，置 PCR 仪中，42℃、1.5h。加入 40μl TE 稀释合成的第一链 cDNA，PCR 仪中，72℃、7min 灭活逆转录酶。样品储存于-20℃。

TE	10mmol/L Tris	pH7.6
	1mmol/L EDTA	

6.6.3.2.2 LD PCR 扩增 cDNA

(1) 分别取 2μl 稀释的 cDNA 3 份加入 PCR 管中，补加 8μl 去离子水将体积调至 10μl。

(2) 按顺序将以下试剂混合，作为一份主混合物：

去离子水	74μl
10×Advantage 2 PCR buffer	10μl
50×dNTP(10mmol/L)	2μl
PCR 引物(10μmol/L)	2μl
50×Advantage 2 聚合酶混合物	2μl
总体积	90μl

(3) 向每个 PCR 反应管中加入 90μl 主混合物，按以下参数开始 PCR 循环：95℃

5min；(95℃、5s，65℃、5s，68℃、6min)×17 循环。

(4) 向每个反应管中加入 2μl 0.5mol/L EDTA 终止反应，储存于−20℃。

6.6.3.2.3 PCR 产物的纯化(PCR 纯化试剂盒)

(1) 向 1.5ml Ep 管中加入 100μl 直接纯化 buffer，然后加入 PCR 产物，涡旋混匀；再加入 1ml 树脂，1min 内涡旋 3 次；

(2) 将小柱子和针管组装在一起，然后加入以上混合物，用注射器针芯正压缓慢冲下；

(3) 用 2ml 80%异丙醇洗柱子，用注射器针芯正压缓慢冲下；

(4) 移去针管，将小柱子放置于一个 1.5ml Ep 管上，10 000r/min 离心 2min 以去除任何残余的洗柱液；

(5) 将小柱子移至一新的 1.5ml Ep 管上，加入 50μl 预热至 65℃的灭菌水，放置 1min 后，室温下 10 000r/min 离心 20s，洗脱 DNA 即可用于酶切。

从两管中各取出 6μl 置于另一干净离心管中，−20℃保存，用于 *Rsa* I 酶切后电泳分析所合成的双链 cDNA 产物的大小和产量。

6.6.3.3 SSH 法构建 Lin^-CD34^+细胞的 cDNA 消减文库(PCR-Select™ cDNA 消减试剂盒)

在利用 SSH 方法构建 Lin^-CD34^-细胞与 Lin^-CD34^+细胞的 cDNA 消减文库实验中，以 Lin^-CD34^-细胞 cDNA 作为检测方(tester)，Lin^-CD34^+细胞 cDNA 为驱动方(driver)，这样获得的即为 Lin^-CD34^-细胞特异表达或高表达，而 Lin^-CD34^+细胞不表达或低表达的基因。

6.6.3.3.1 *Rsa* I 酶切

(1) 分别用 *Rsa* I 酶切检测方及驱动方 cDNA 以产生大小合适的平头末端的 cDNA 片段。反应体系：

dsDNA	43.5μl
10×*Rsa* I buffer	5.0μl
Rsa I(10U/μl)	1.5μl
总体积	50.0μl

(2) 混匀后稍微离心，置 37℃孵育 2h。

(3) 取 5μl 酶切产物和 2.5μl 冻存的未酶切双链 cDNA 并排在一 1.0%的琼脂糖/EtBr 凝胶上电泳(1×TAE 电泳缓冲液)，根据 cDNA 片段大小分布判断酶切效率。

(4) 鉴定酶切完全后，向反应体系中加入 2.5μl 20×EDTA/糖原混合物终止反应。

(5) 向管中加入 50μl 酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1)，充分振荡混匀后，室温、14 000 r/min 离心 10min，分离各相。

(6) 小心将上层水相移至另一新的 Ep 管中，废弃中间蛋白层及下层有机相。

(7) 向上层水相中加入 50μl 氯仿∶异戊醇(24∶1)，振荡混匀，室温、14 000r/min 离心 10min，分离各相后再将上层水相移至另一干净的 Ep 管中。

(8) 加入 25μl 4mol/L NH_4OAc 和 187.5μl 95% 乙醇，充分振荡混匀后，室温、14 000 r/min 离心 20min，小心弃去上清。

(9) 80%乙醇 200μl 洗涤沉淀，14 000r/min 离心 10min，小心弃去上清。

(10) 空气干燥沉淀，并将沉淀溶于 5.5μl 无菌水中，−20℃保存。

6.6.3.3.2 检测方双链 cDNA 两端接头的连接

(1) Lin⁻CD34⁻细胞(作为检测方)双链 cDNA 经 *Rsa* I 酶切后，在两端连接相应的接头：

从以上酶切后的检测方 cDNA 中取出 1μl，用 5μl 无菌 H_2O 稀释，均分成 2 等份，分别与接头 1 和接头 2R 连接，反应体系如下：

组成	检测方 1-1 管	检测方 1-2 管
稀释的检测方 cDNA	2μl	2μl
接头 1(10μmol/L)	2μl	—
接头 2R(10μmol/L)	—	2μl
5×连接 buffer	2μl	2μl
T_4 DNA 连接酶(400U/μl)	1μl	1μl
无菌水	3μl	3μl
总体积	10μl	10μl

分别从检测方 1-1 和检测方 1-2 中各吸取 2μl，共同置于一新的微量离心管中，作为未消减的检测方对照 1-c。混匀后稍微离心，16℃水浴过夜。加入 1μl EDTA/糖原混合物终止连接反应，于 72℃加热样品 5min 灭活连接酶，样品储存于−20℃备用。

(2) 接头连接效率分析：为保证后续实验的顺利进行，至少需要有 25%的检测方双链 cDNA 连有接头，因此需进行接头连接效率分析。接头连接效率分析采用的是 PCR 方法。

取分别连有接头 1 和接头 2R 的检测方 cDNA 各 1μl，用无菌水稀释至 200μl，配制接头连接效率分析 PCR 反应体系：

组成	管 1	管 2	管 3	管 4
无菌水	18.5μl	18.5μl	18.5μl	18.5μl
连有接头 1 的检测方 cDNA	1μl	1μl	—	—
连有接头 2R 的检测方 cDNA	—	—	1μl	1μl
G3PDH 3′引物(10μmol/L)	1μl	1μl	1μl	1μl
G3PDH 5′引物(10μmol/L)	—	1μl	—	1μl
PCR 引物 1(10μmol/L)	1μl	—	1μl	—
10×PCR 反应 buffer	2.5μl	2.5μl	2.5μl	2.5μl
dNTP 混合物(每种 10mmol/L)	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
50×Advantage 2 聚合酶混合物	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
总体积	25.0μl	25.0μl	25.0μl	25.0μl

混匀后短暂离心，放入 PCR 仪中 75℃孵育 5min 以补平接头，随后立即开始 PCR

反应，条件如下：94℃、30s；(94℃、10s，65℃、30s，72℃、2.5min)×20 循环。取 PCR 产物 5μl 经 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段大小。结果应为管 1 和管 2，管 3 和管 4 中产物的电泳条带强弱基本一样，它们之间的强度之差应小于 4 倍(图 6.6)，这种结果说明至少有 25%的检测方 cDNA 连上了相应的接头。

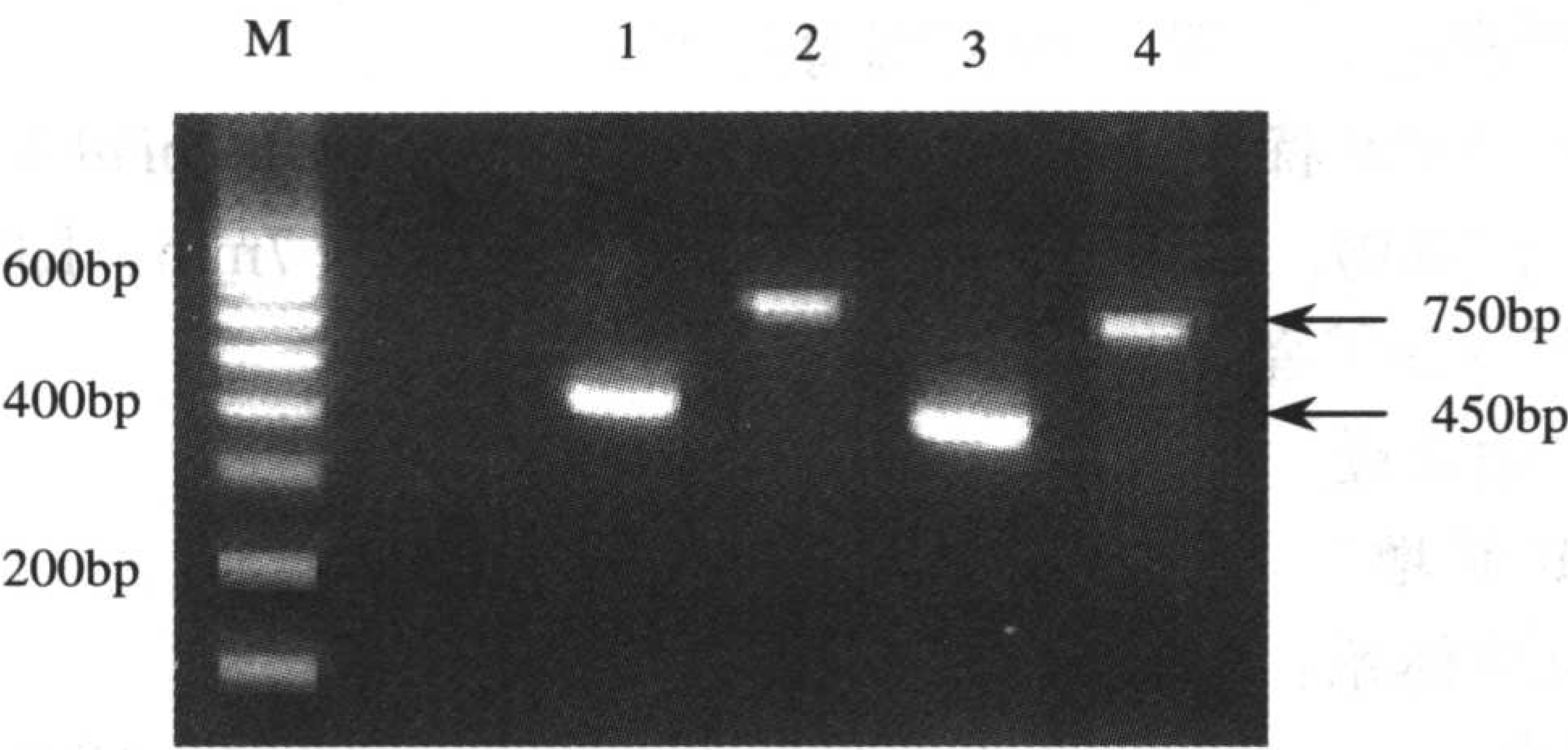


图 6.6 接头连接效率分析

M：DNA 分子质量标准；1~4 分别表示管 1~4 PCR 产物电泳结果

6.6.3.3.3 杂交

1) 第一次杂交

将过量的驱动方 cDNA 分别加入两管检测方 cDNA 中，变性后退火杂交。

建立第一次杂交反应体系：

组成	管 1	管 2
Rsa I 消化的驱动方 cDNA	1.5μl	1.5μl
接头 1 连接的检测方 1-1cDNA	1.5μl	—
接头 2R 连接的检测方 1-2cDNA	—	1.5μl
4×杂交 buffer	1.0μl	1.0μl
总体积	4.0μl	4.0μl

混匀后稍离心，每管中加入 50μl 矿物油覆盖，98℃变性 1.5min，68℃杂交 8h，然后立即进行第二次杂交。

2) 第二次杂交

(1) 首先在一支 Ep 管中将以下试剂混匀：

Rsa I 消化的驱动方 cDNA	1.0μl
4×杂交 buffer	1.0μl
无菌水	2.0μl
总体积	4.0μl

(2) 混匀后取出 1μl 置于一支 0.2ml 微量离心管中，加入一滴矿物油覆盖；

(3) 将微量离心管放置 PCR 仪中 98℃温育 1.5min，然后移出新变性的驱动方 cDNA；

(4) 通过下面的操作将新变性的驱动方 cDNA 同第一次杂交的样品 1 与 2 同时混合，以保证两个杂交样品仅仅在新鲜变性的驱动方 cDNA 存在情况下同时混合在一起：首先

将微量移液器设在 15μl，在含有杂交样品 2 的离心管中轻轻将移液器吸头触及矿物油/样品的交界处，小心将所有的样品吸入吸头，然后移开吸头并吸入少量的空气，在样品的小滴下制造一小段空气空间；随即在含有新鲜变性驱动方的离心管中重复相同的操作，此时吸头应该含有被一小块空气隔开的两种样品，最后将全部的混合物移入含有杂交样品 1 的试管中，上下吹吸混匀。

(5) 混匀并短暂离心后，置于 68℃温育过夜。

(6) 最后加入 200μl 稀释 buffer (20mmol/L Hepes-HCl, pH8.3; 50mmol/L NaCl; 0.2mmol/L EDTA, pH8.0)，混匀，再将样品置于 68℃加热 7min，即可作为第一次 PCR 反应的模板。储存于−20℃备用。

6.6.3.3.4 PCR 扩增反应

1) *第一轮 PCR 扩增*

第一轮 PCR 反应体系：

无菌水	19.5μl
10×PCR 反应缓冲液	2.5μl
dNTP 混合物(每种 10mmol/L)	0.5μl
PCR 引物 1(10μmol/L)	1.0μl
50×Advantage 2 聚合酶混合物	0.5μl
模板	1.0μl
总体积	25.0μl

混匀后短暂离心，并滴加 50μl 的矿物油覆盖反应物，于 PCR 仪中 75℃延伸 5min 补平接头，随即按下述条件开始 PCR 反应：94℃预变性 25s，(94℃、30s，64℃、30s，72℃、90s)×30 循环，72℃延伸 10min。PCR 引物 1 为接头 1 和接头 2R 5'端共同寡核苷酸序列。

2) *第二轮 PCR 扩增*

将第一轮 PCR 产物稀释 10 倍后，取 1μl 作为模板，利用巢式引物进行第二次 PCR 扩增，反应体系如下：

无菌水	18.5μl
10×PCR 反应缓冲液	2.5μl
巢式 PCR 引物 1(10μmol/L)	1.0μl
巢式 PCR 引物 2R(10μmol/L)	1.0μl
dNTP 混合物(每种 10mmol/L)	0.5μl
50×Advantage 2 聚合酶混合物	0.5μl
模板	1.0μl
总体积	25.0μl

反应条件：(94℃、30s，68℃、30s，72℃、90s)×15 循环，72℃、10min。

3) *PCR 产物的电泳分析*

从第一次和第二次 PCR 产物中各吸取 8μl 于 2%的琼脂糖凝胶上进行电泳，观察扩增产物的大小分布。利用巢式引物进行二次 PCR 扩增后，消减后的样品为夹杂有明显扩增条带的弥散条带，保证了消减杂交产物的质量。

6.6.3.3.5 消减效率的 PCR 分析

利用 PCR 扩增的方法，通过比较持家基因在消减前后丰度的差别来分析消减效率。这里所采用的是持家基因 *G3PDH*。

(1) 将消减和未消减(未消减的检测方对照 1-c)的二次 PCR 产物 10 倍稀释于水中，确保消减和未消减 PCR 产物的浓度大致相等；

(2) 以所示的顺序在一支 0.2ml 微量离心管中混合以下试剂：

组成	管 1	管 2
稀释的消减 cDNA(二次 PCR 产物)	1.0μl	—
稀释的未消减检测方对照 1-c(二次 PCR 产物)	—	1.0μl
G3PDH 3′引物	1.2μl	1.2μl
G3PDH 5′引物	1.2μl	1.2μl
无菌水	22.4μl	22.4μl
10×PCR 反应缓冲液	3.0μl	3.0μl
dNTP 混合液(每种 10mmol/L)	0.6μl	0.6μl
50×Advantage 2 聚合酶混合物	0.6μl	0.6μl
总体积	30.0μl	30.0μl

振荡混匀后短暂离心，并滴加一滴矿物油覆盖反应物；

(3) 将其置于 PCR 仪中按照下面的程序进行 18 个循环：94℃、30s，60℃、30s，68℃、2min；

(4) 从每个反应中吸取 5μl,并置于另一干净的 Ep 管中,将反应的剩余部分放回 PCR 仪中再进行 5 个循环；

(5) 重复以上步骤 2 次(即在 28 和 33 个循环后各吸取 5μl)；

(6) 在 2.0%的琼脂糖凝胶上同时检测在 18、23、28 和 33 个循环时从每个反应中所吸取的 5μl 样品，观察 G3PDH 的特异性扩增情况。结果见图 6.7。

经两轮消减杂交后 G3PDH 在 33 个循环后方可扩增出来，而未经消减的对照则在 18 个循环时便可见到明显的特异性扩增带，说明经过两轮杂交和两次抑制 PCR 已经使持家基因被有效地消减下去，而差异基因得到了富集。

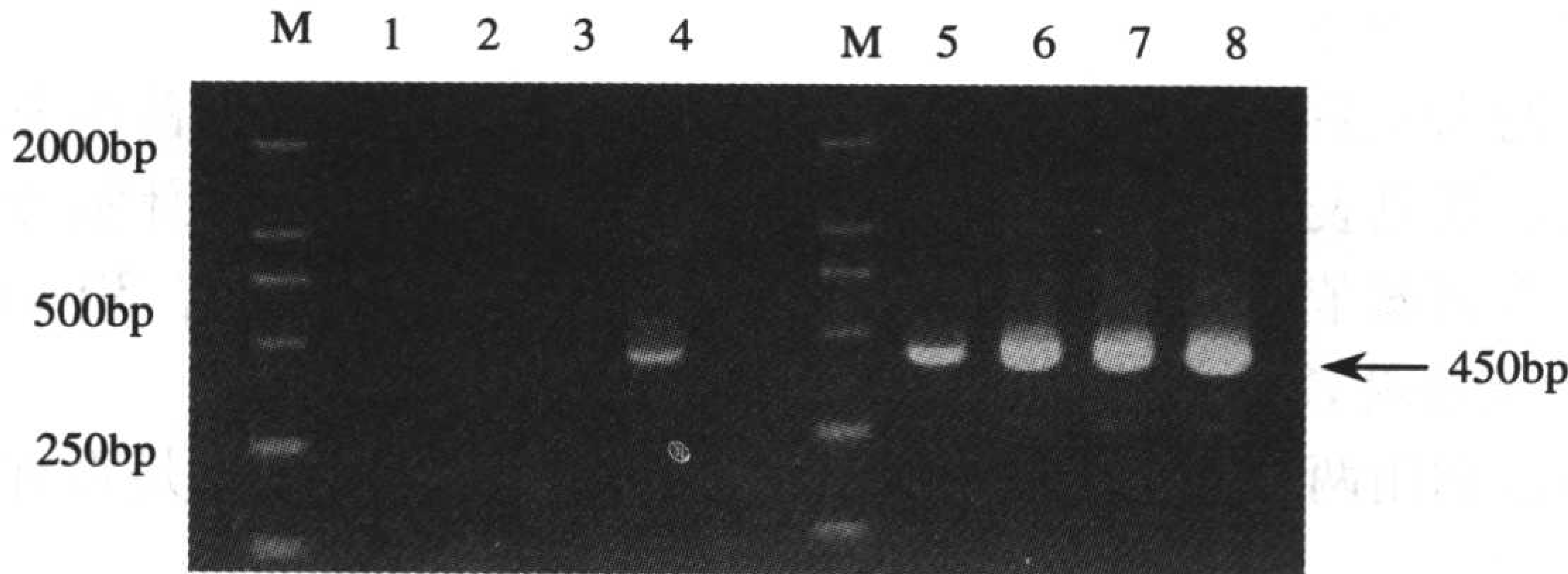


图 6.7 G3PDH 丰度 PCR 检测验证消减杂交效率

M：DL2000 标准；1~4 泳道为消减后的产物；5~8 泳道为未消减的产物。

扩增循环数：1 泳道 518 个；2 泳道 623 个；3 泳道 728 个；4 泳道 833 个

6.6.3.4 消减后 PCR 产物的克隆

经 2 次 PCR 扩增的消减产物，用于回收构建文库。

6.6.3.4.1 PCR 产物的回收(DNA 快速纯化回收试剂盒)

(1) 从琼脂糖凝胶上切下目的条带放入 1.5ml Ep 管中，用一个 Tip 头捣碎，动作轻柔；

(2) 准确估计凝胶的体积，加入 3 倍体积的溶胶液，室温放置 5min 或 50℃保温 3min，其间轻摇 Ep 管几次使胶完全溶化；

(3) 涡旋混匀玻璃奶，向溶胶中加入 10μl，颠倒混匀，冰浴 10min，并且间隔 2~3min 颠倒混匀一次，12 000r/min 离心 30s，吸弃上清；

(4) 将浓缩漂洗液按 3∶7 与无水乙醇配成工作液，然后向玻璃奶中加入 250μl，用加样器吸漂洗液轻柔地将玻璃奶冲散混匀，12 000r/min 离心 30s，吸弃上清；

(5) 重复第(4)步一次。吸取完漂洗液后再离心 10s，用 Tip 头将最后一点儿漂洗液吸干净，然后放置于 37℃温箱中干燥 20min；

(6) 加 20μl Millipore H_2O，用 Tip 头轻轻混匀，60℃水浴 5min，12 000r/min 离心 1min，回收上清即为纯化的 PCR 片段。–20℃储存。

6.6.3.4.2 PCR 产物与 T 载体的连接

为了产生可被限制性内切核酶酶识别的酶切位点，同时方便测序，首先将回收的 PCR 产物与 T 载体连接。连接采用 pGEM®-T Easy Vector System。

连接体系：

2×快速连接 buffer	5.0μl
pGEM®-T Easy 载体	1.0μl
PCR 回收产物	3.0μl
T4 DNA 连接酶(3weiss 单位/μl)	1.0μl
总体积	10.0μl

4℃过夜。

6.6.3.4.3 连接产物的转化

参照 6.5.5 基因的重组连接。

6.6.3.4.4 转化重组子的鉴定

1) α 互补现象的检查

将长有菌落的 LB 平板于 4℃放置 2h，使表达有半乳糖苷酶的菌落充分显色。观察菌落的着色情况，蓝色表明为非重组子，白色则为重组子，用无菌牙签分别挑取白色菌落，接种于 5ml 含有氨苄的 LB 液体培养基中，37℃振摇培养过夜，30%甘油冻存。

2) 重组子中克隆片段的 PCR 扩增

挑取白色菌落利用两端接头上的巢式引物进行 PCR 扩增，观察是否有片段插入以及插入片段的大小。

(1) 首先在 0.2ml 微量离心管中配制 PCR 反应体系：

10×PCR 反应 buffer	2.5μl
dNTP 混合物(2.5mmol/L)	2.0μl

上游巢式引物	0.5μl
下游巢式引物	0.5μl
无菌水	17.5μl
总体积	23.0μl

(2) 用吸头蘸取部分菌落，在上面配制的PCR体系中搅拌均匀，置PCR仪上，95℃加热5min裂解细菌；

(3) 补加Taq DNA聚合酶(0.3U/μl)2μl后，进行PCR循环，循环参数为：(95℃、30s，68℃、30s，72℃、2min)×30循环，72℃延伸7min；

从PCR产物中取5μl于1.0%的琼脂糖凝胶上电泳，观察特异性扩增片段的有无及大小。

6.6.3.5 文库质量评价

本消减文库共挑取克隆616个，经PCR鉴定，其中含有插入片段的阳性克隆有593个，阳性率为96%。在这些阳性克隆中，PCR扩增片段大小分布于150~1000bp的范围内，主要集中于300~500bp。

6.6.3.6 部分差异表达基因的生物信息学分析

在以上经PCR鉴定具有插入片段的阳性克隆中随机选取一部分进行测序(由测序公司完成)，测序结果与互联网上已有的数据库进行同源性比较、EST拼接、功能域预测等生物信息学分析，探讨差异表达基因在$Lin^{-}CD34^{-}$细胞中表达的作用和意义。

(1) 所测定的序列用Blast N软件与公共数据库进行比较。数据库为：①NCBI的nr库，其中包括了GenBank、EMBL(european molecuLar biological laboratory)、DDBJ(DNA database of Japan)以及PBD(protein database)所收录的所有非冗余(non-redundant)序列；②NCBI的EST(expressed sequence tag)库。

(2) 所测EST序列的分类和组成类型分析。按照序列与公共数据库同源性比较结果给出的Score值，结合EST的长度将所测定的EST序列分成3类：已知序列(同源性>90%)(染色体、线粒体、蛋白质)、同源序列(同源性40%~90%)和未知新序列(同源性<40%)。

(3) 根据各基因的信息提示选择感兴趣的基因展开进一步的研究。

(王冬梅　谢小燕)

6.7 干细胞增殖分化调控研究范例II——由功能分子到生命现象的调控

*notch*基因于1919年在果蝇体内被发现，该基因影响了果蝇翅膀缺刻(notch)的形成及神经和上皮组织的发育。1983年，果蝇的*notch*基因被克隆，随后在包括人在内的多个物种中也分离出notch同源物。后续的研究显示，在哺乳动物中，notch信号通路对于决定胚胎发生、造血及神经干细胞分化的命运起着至关重要的作用(鲁茁壮等

2004)。

证实人类正常骨髓造血干/祖细胞存在 *notch1* 表达以后，为确定 notch 分子在造血干/祖细胞的存活、增殖、分化过程中的作用，不同的研究小组都对此进行了研究。以下以 Schroeder 等(2000)的研究为例，分析 notch 调控模式细胞 32D 髓系分化的作用及其机制。

6.7.1 利用 EST2 诱导体系表达 notch 细胞内结构，确定其对分化的影响

6.7.1.1 研究策略

(1) 构建 OHT 可诱导的 $mN1^{IC}$ 逆转录病毒表达载体。为实现鼠 notch1 的可控表达，选取 mNotch1 胞内结构域的编码段，置于突变型人雌激素受体(ERT2)的胞外结构域之后形成融合蛋白，ERT2 能对 4-羟基三苯氧胺(OHT)发生响应，通过添加 OHT 与否就能实现对 notch 的表达调控。此外，在缺少商品化 notch 抗体的情况下，选用标签蛋白与 notch 融合表达，利用标签蛋白的抗体实现对 notch 的表达、定位研究。

逆转录病毒携带外源基因能实现高效转染并将外源基因稳定整合到宿主基因组中，为实现 notch 在鼠 32D 细胞中的高效表达，采用以鼠胚胎干细胞病毒 MESV 为基础的逆转录病毒 p50-X-neo 载体，该病毒带有新霉素抗性基因 *neo*。通过转染和病毒包装，外源基因整合后 *neo* 基因与 *notch* 基因共同形成转录物，随后单独翻译表达，用于筛选和功能研究。

(2) 根据已知信息，Jk 位点重组识别序列结合蛋白(recombination recognition sequence binding protein at the Jk site，RBP-J)与 notch 在核内结合，在对靶基因的表达调控中起重要作用，因此构建报道质粒 pGa981-6，该质粒在小β-珠蛋白启动子前有 12 RBP-J 结合位点，能调控萤光素酶基因的表达，用于检测 RBP-J 的反式调控活性受 notch 影响后的变化。通过加入萤光素酶底物，分析荧光水平的高低，能直接判断出 RBP-J 活性的高低。

(3) 32D 细胞在高 IL-3 存在下维持增殖、不分化的集落；当加入 G-CSF 并减少 IL-3 时 32D 发生分化。根据 32D 细胞向粒系分化是细胞因子依赖性的特点，利用半固体培养基加入不同的细胞因子和诱导物，检测集落形成能力，用于分析 notch1 的活化对 32D 细胞分化的影响。对于转染了 mNotch 的 32D 细胞(32D-mNotch)，在促分化的因子环境中检测细胞表型的转变，检测方法为：染色鉴定、造血细胞系表面标志的流式细胞术鉴定。

6.7.1.2 主要设备与试剂

Gene PulserII 电转仪(Bio-Rad)、流式细胞仪(Becton Dickinson)、IL-3、G-CSF、4-羟基三苯氧胺(OHT)、G418、Flag、myc 抗体。

6.7.1.3 实验方法

(1) 根据 DDBJ/EMBL/GenBank 提供的 *mNotch1* 基因构建 notch 表达载体。取 mNotch

第1751~2290位氨基酸，N端融合Flag标签(Sigma Europe)，测序确定融合序列编码的正确性。随后ERT2的第282~595位氨基酸对框(不存在移码)融合于其C端表达。完整的可读框克隆到p50-X-neo载体的多克隆位点中，构建成的质粒命名为rNERTneo。空白质粒仅含*neo*基因用作对照转染。

(2) 32D细胞培养在IMDM维持培养基中，IL-3的浓度可刺激细胞增殖。细胞密度维持在5×10^4~5×10^6个/ml。其支原体含量通过支原体PCR ELISA试剂盒进行常规监控，并对细胞的增殖率、因子依赖性和分化度都进行了监控。

IMDM维持培养基：IMDM、10%胎牛血清、鼠IL-3条件培养液(mIL-3 CM)150U/ml。

(3) 电转逆转录病毒载体rNERTneo到32D细胞中，条件是320V、1050μFa、无穷大电阻。400μl常规培养基中的4×10^6个细胞在Bio-Rad 4mm电转杯中进行转染。用于GFP筛选的转染质粒量为20~50μg。转染成功后以G418抗性筛选并加入IL-3作为32D的维持培养因子，在软琼脂培养基中培养集落。筛选获得的细胞系以EST2抗体Western印迹鉴定外源基因的表达，确定稳定转染的细胞。

(4) 加入OHT到培养基中至终浓度达50nmol/L活化mN^{IC} 32D细胞中notch的表达。

(5) 免疫荧光染色：培养在IL-3中的32D细胞克隆在有或无OHT的条件下作用12h，随后细胞涂片、风干并在室温下以甲醇固定7min。固定的细胞在含10% FCS的PBS中室温孵育30min，抗人雌激素受体α的鼠单克隆抗体以1∶100稀释到含1% BSA的PBS用做一抗，细胞涂片在37℃下与一抗孵育1h。以1% BSA的PBS洗涤3次，细胞再与二抗37℃孵育1h，二抗为以1∶100稀释到含1% BSA的PBS中的Cy3连接的羊抗鼠IgG抗体。随后，细胞以含1% BSA的PBS洗涤3次，固定在荧光固定液中。显微玻片以Axiophot显微镜观察，Minolta Sprint Scan 35玻片扫描仪扫描，单个图片以Microsoft PowerPoint软件确定。

(6) RBP-J依赖的报告分析系统的转染：32D细胞以10μg不同的notch构建载体和5μg报道质粒pGa981-6共转染。细胞在有或无50nmol/L OHT的情况下进行培养，24h后收集在裂解液中。细胞4℃、20 000*g*离心10min，再检测上清的萤光素酶活性。转染效率利用平行的CMV-Luc单独转染确定，该质粒带有CMV启动子和增强子调控的萤光素酶基因。RBP-J反式活化报道基因的特异性通过质粒pGa50-7的平行对照转染确定，该质粒的萤光素酶基因仅处于小*β*-珠蛋白启动子的调控之下。

裂解液：PBS、1% Triton X-100、1mmol/L二硫苏糖醇(DTT)。

(7) 32D细胞的分化诱导：细胞在含10% FCS的IMDM培养基中洗涤一次，以2×10^5个/ml的密度接种于分化培养基中，在选定的时间点取出部分细胞进行分析。

分化培养基：IMDM、10% FCS、1000U/ml hG-CSF。

(8) May-Grunwald-Giemsa染色判断32D细胞的分化。细胞根据以下的标准分类：①未分化的32D细胞(爆式集落)：嗜碱性降低(深蓝色)胞质，核单个、大、相对较圆、边缘清晰、有高密度的染色质结构、含多个核仁；②早期粒系细胞(早幼粒和中幼粒细胞)：浅蓝色嗜中性粒细胞，哑铃状收缩核，很少或几乎没有核仁，粗糙的核染色质，胞质边缘浅色嗜酸性，胞质/核比例提高；③晚期粒细胞(晚幼粒细胞和嗜中性粒细胞)：带状或分段核，边缘粗糙，聚集的染色质结构，浅色、嗜酸性胞核，提高的胞质/核比。通过100~200个细胞盲选计数确定分化的比例。

(9) FACS 分析：FITC 连接的 CD11b(Mac-1)和 Gr-1 单克隆抗体用于分析 32D 细胞的粒系分化水平。离心收集细胞，在含 3% FCS 的 PBS 中重悬。Fc 封闭抗体以 1∶100 稀释，在室温下添加作用 5min。随后，FITC 标记的 mCD11b 直接抗体或 FITC 标记的 Gr-1 直接抗体或 FITC 标记的同源匹配对照抗体以 1∶100 稀释加入，室温下暗室孵育 45min，再洗涤 2 次并重悬在含 1% FCS 和 1μg/ml PI 的 PBS 中。FACS 的分析用 becton Dickinson FACScan 仪和 Cell Quest 软件来进行。

(10) 细胞的集落形成能力分析：在有或无 OHT 的情况下，转染后的细胞 rneo 或 rNERTneo32D 细胞在培养 4 天后取出，按不同的细胞密度(30 个/ml、100 个/ml、300 个/ml 和 1000 个/ml)三等分接种在集落培养基中，其中分别添加或缺少 OHT。7 天后计数大于 50 细胞的集落。

集落培养基：IMDM、10% mIL-3 CM(150U rIL-3/ml)、10% FCS、0.3% 琼脂。

6.7.1.4 结果判断

(1) 在加入 OHT 的条件下，利用 ERT 抗体进行免疫荧光检测，结果显示 notch 转移到核内，通过报道基因的表达分析显示，这一条件下 RBP-J 是活化的。没有 OHT 的作用时，免疫荧光显示 notch 都处于胞质中，也检测不到 RBP-J 的反式活化活性。因此 notch 的活化能进一步活化 RBP-J 发挥转录调控功能(图 6.8)。

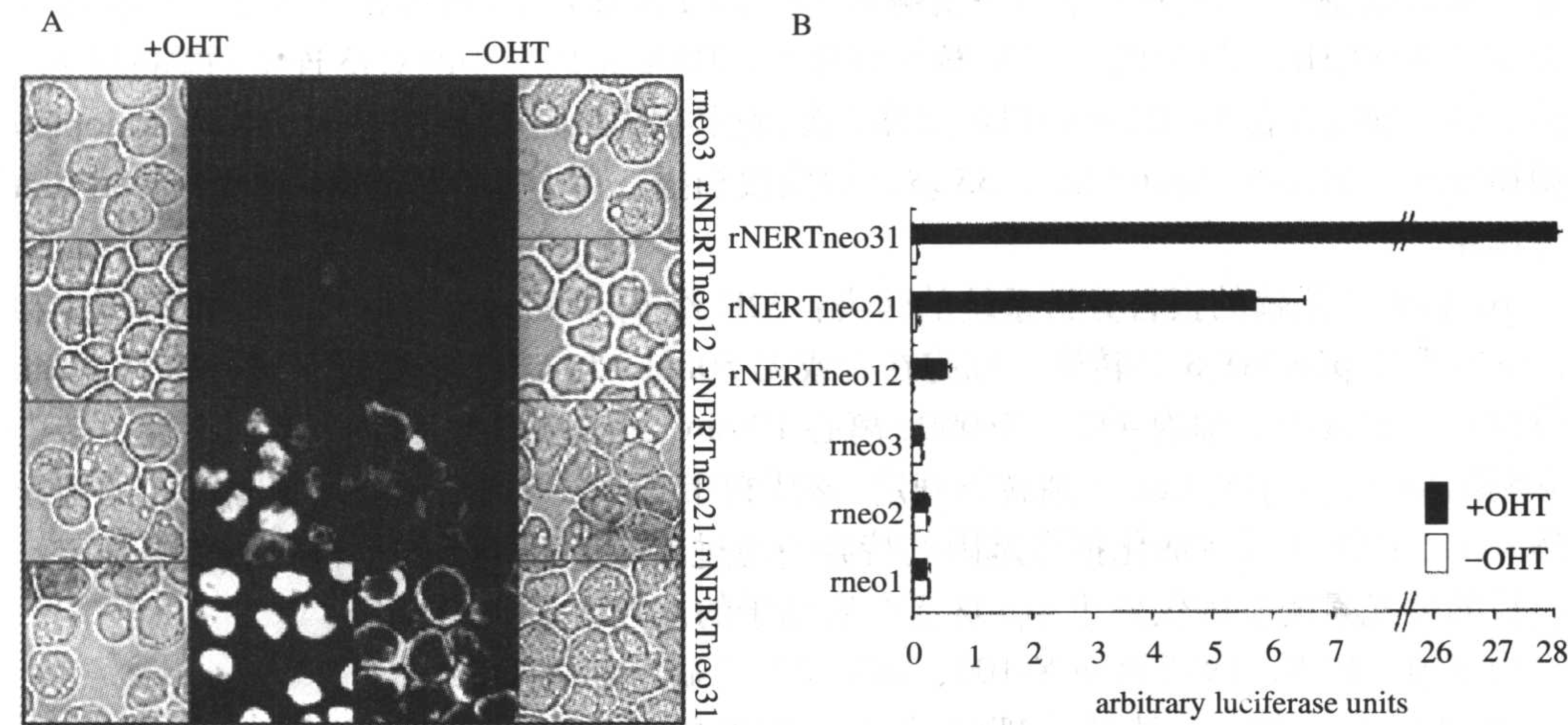


图 6.8 OHT 活化 notch 进入核内发挥反式调控作用(Schroeder et al. 2000)

A. 免疫荧光检测显示 OHT 诱导下 notch 进入细胞核中；B. 萤光素酶报道系统分析显示，OHT 活化的 notch 能增强 RBP-J 的反式活化活性

(2) 在维持自我更新的条件即仅添加 IL-3 的条件下，加入 OHT 时 32D-mNotch 仍有少量分化现象(图 6.9)。在分化培养条件中，32D-mNotch 形成的集落极少，但在维持自我更新条件下，加入 OHT 也有少量集落出现。因此 notch1 的活化减少 32D 细胞的自我更新同时诱导分化，它即使在存在 IL-3 时也起作用，但无 IL-3 时效果更明显。

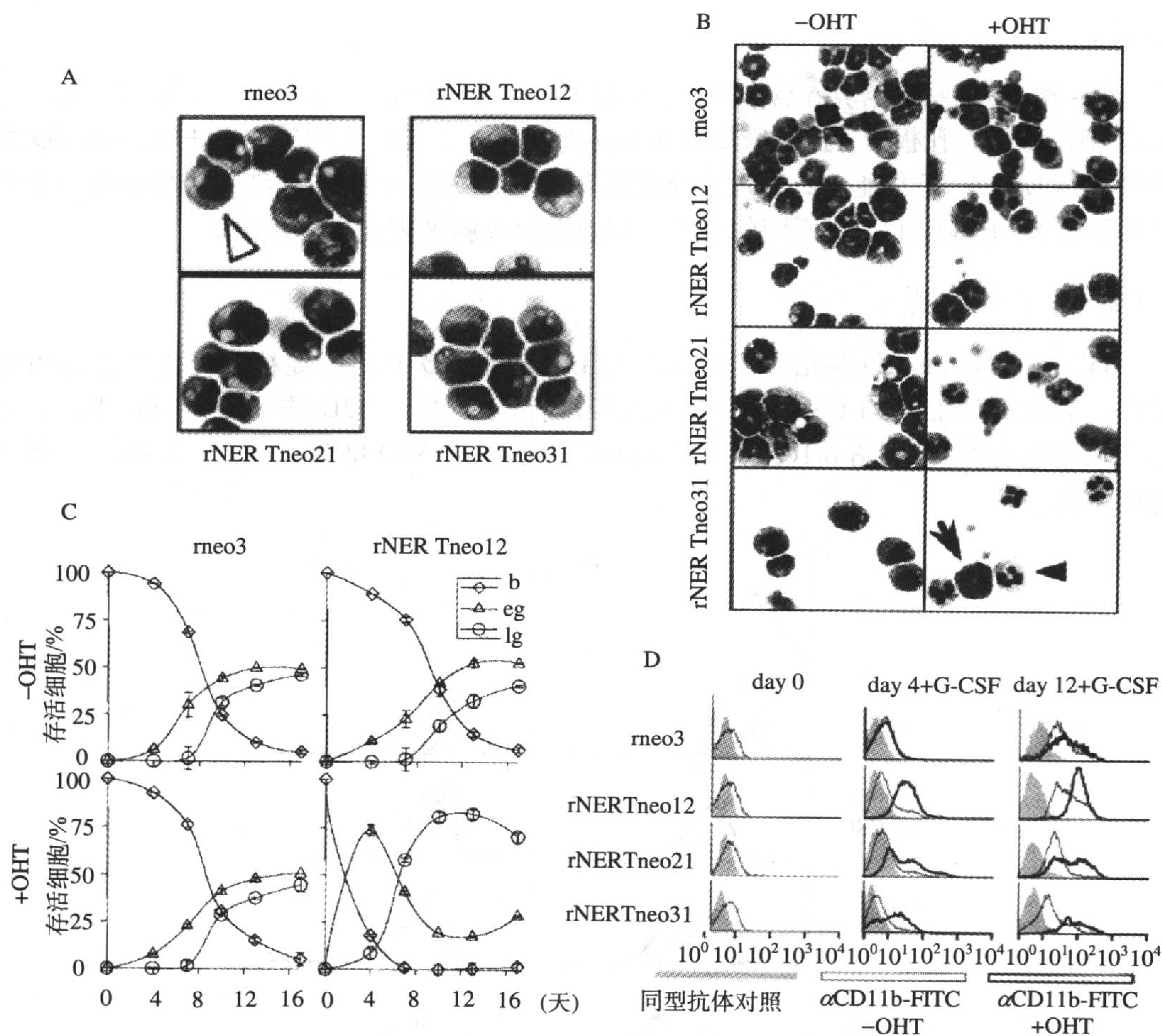


图 6.9　notch 促细胞分化的检测(Schroeder et al. 2000)

A、B. 转染并诱导后的细胞染色显示 OHT 诱导的 notch 促分化现象；C. 细胞计数显示 notch 促分化能力；D. 流式细胞术检测细胞表面标志显示 notch 的促分化现象

6.7.2　成维细胞表达 notch 配体 Jagged1，与 32D-mNotch 细胞共培养，检测配体的分化诱导作用

6.7.2.1　研究策略

利用表达 Jagged1 的成纤维细胞 JT 作为 32D 细胞共培养的诱导体系，以无 Jagged1 表达的 JT 细胞的母 Ltk-细胞作为对照。32D 转染全长 mNotch1 构建细胞株 FLNotch32D 作为共培养体系的被诱导细胞，其对照是转染空载体的 neo32D 细胞和未转染的 32D 细胞。将它们与成纤维细胞共培养，检测表面标志的变化以确定细胞的分化水平。

6.7.2.2　主要设备与仪器

同 6.7.1.2。

6.7.2.3 实验方法

Ltk-和 JT 细胞系培养在含 10% FCS 的 IMDM 培养基中。在共培养实验中，Ltk-或 JT 细胞接种于 6 孔板中，控制密度在次日达 50%汇合。12h 后，10^5 个的 FLNotch32D 细胞接种到 Ltk-或 JT 细胞中，采用分化培养基培养，每 3 天将 32D 细胞转移到新鲜准备的 Ltk-或 JT 细胞层上。在不同的培养时间点取出细胞做表面标志检测。

6.7.2.4 结果判断

JT 与 FLNotch32D 共培养，比 Ltk-与 FLNotch32D 共培养促粒系分化的能力明显提高，后者即使加入 G-CSF 分化水平也不如前者。但 neo32D 或 32D 与 JT 共培养时分化水平也有所提高(图 6.10)，可见 Jagged1 也能促进 32D 细胞自身 notch 的表达和功能的发挥。

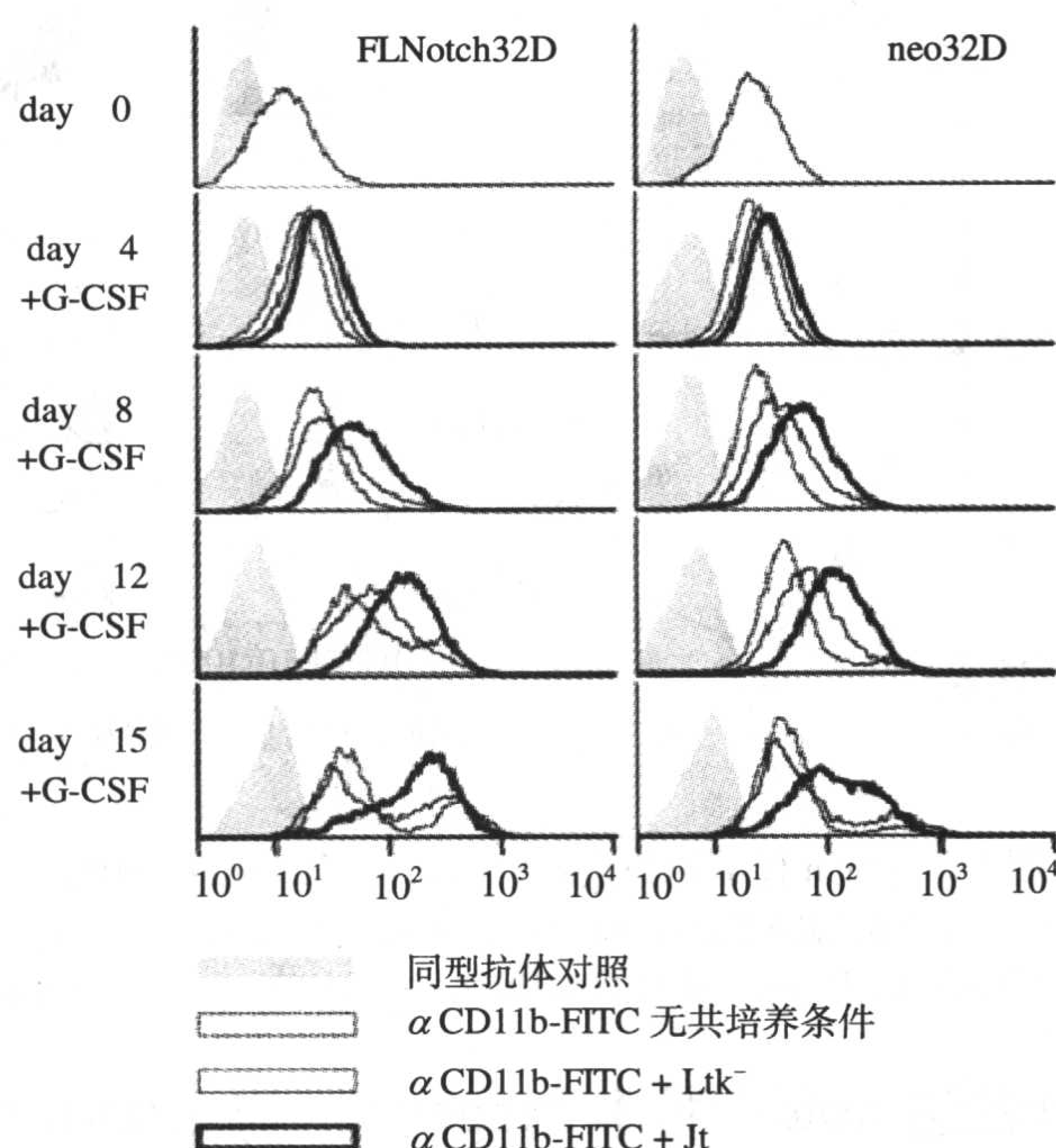


图 6.10 流式细胞术检测不同的共培养条件下 FLNotch32D 细胞或 neo32D 细胞表面 CD11b 表达水平的区别(Schroeder et al. 2000)

6.7.3 对 notch 信号途径的研究

6.7.3.1 研究策略

为确定 notch 在信号传导中发挥功能的结构域、确定不同部位 mNotch1 在分化中的作用，对 *notch* 基因的胞内不同区段分别克隆并进行功能鉴定。要确定 notch 促粒系分化的效果是否确实通过 RBP-J 完成，将 RBP-J 与病毒反式活化域 VP16 融合表达获得

RBP-J-VP16，即 RBP-J 的反式活化形式，转染 RBP-J-VP16+GFP 观察细胞表型的变化来确定。

6.7.3.2 主要设备与试剂

同 6.7.1.2。

6.7.3.3 实验方法

(1) 为构建不同的 $mN1^{IC}$-GFP 和 RBP-J-VP16-GFP 载体，利用 CMVeGFP 质粒为骨架。它含有人巨细胞病毒(hCMV)启动子、多克隆位点(MCS)、内部核糖体进入位点(IRES)以及完整的 5'→3'eGFP 的可读框(ORF)。不同的 $mN1^{IC}$(鼠 notch1 胞内区)片段被克隆插入到 CMVeGFP 的 MCS 中，根据构建的部位和标签的位点命名如下：aa1751-2531(NIC^{FL}-GFP，myc 标签在 2293 和 2294 之间，来自质粒 pEFBos neo Notch)；aa1804-2531(NIC^{FL} ΔRAM-GFP，N 端 Flag 标签)；aa1751-2293(NICΔOP-GFP，N 端 Flag 标签)；aa1751-2183 (NICΔOPΔC-GFP，N 端 Flag 标签)；aa1810-2183(NICΔOPΔCMilner-GFP，6 个 N 端 Flag 标签)；aa1804-2183(NICΔOPΔCΔRAM-GFP)。

(2) 不同区段的 $mN1^{IC}$ 表达载体电转染 32D 细胞，转染后 48h 经 GFP FACS 分选阳性转染细胞。细胞离心收集并重悬在含 3% FCS、2μg/ml PI 和 25μg/ml DNase 的 PBS 中，细胞团通过过滤尼龙筛网除去，活的、GFP 阳性的细胞通过 becton Dickinson FACS Star Plus 仪进行分选，未转染的细胞用于设定 GFP 阴性细胞门。随后利用标签蛋白 Flag、myc 的抗体以 Western 印迹法确定截短蛋白的表达。

(3) 第 9 天在诱导分化的体系(+G-CSF、-IL-3)中检测细胞的分化水平。检测内容同样包括表型变化、细胞表面标志的判断。

(4) 构建 RBP-J-VP16-GFP：将不带 poly(A)信号含 RBP-J-VP16 ORF 的 PCR 产物插入 CMVeGFP 载体中得到 RBP-J-VP16-GFP。对照载体 tTa-GFP 的构建是通过将四环素依赖的反式活化子 ORF 从 pUHD15-1 质粒中切出克隆到 CMVeGFP 中得到。共转染 tTa-GFP 和报道质粒 pUHC13-3 到 32D 细胞中，tTa-GFP 表达 VP16 反式活化结构域，在缺少四环素时，tTa 能诱导 32D 细胞中萤光素酶的高表达。

(5) 统计学分析：统计学上的区别以学生氏 t 检验成对数据分析进行。

6.7.3.4 结果判断

(1) 不同的 $mN1^{IC}$-GFP 表达载体与报道质粒 pGa981-6 共转染，能检测到 RBP-J 的反式活化依赖的信号途径；含 RAM23 区段的 notch 促报道基因强表达，含 C 端 OPA 和 PEST 序列的 notch 也有作用(图 6.11)。可见粒系成熟的提高与 RBP-J 信号途径活化相对应，但需要 notch 的 RAM 和 ankyrin 蛋白样重复序列。

(2) 表达 $mN1^{IC}$ 蛋白的细胞都有明显的粒系分化，分化程度与 RBP-J 依赖的信号途径反式活化程度无关，因此低水平的 RBP-J 依赖的活化仍能保证其生物效应。

(3) 转染 RBP-J-VP16+GFP 的细胞表型变化比转染全长 notch 强得多，而对照组转染 tTa(仅含 VP16)不改变 32D 的分化。因此 RBP-J-VP16 对 notch 信号十分重要，活化的 RBP-J 能促粒系分化。

mNotch1^{IC}构建体	区域结构	RBP-J 依赖的反式活化
NICΔOPΔCΔRAM		0
NICΔOPΔC^{Milner}		$3.0\times10^2 \pm 4\times10^1$
NIC^{FL}ΔRAM		$3.5\times10^3 \pm 1\times10^2$
NICΔOPΔC		$9.0\times10^4 \pm 5\times10^1$
NICΔOP		$3.4\times10^5 \pm 5\times10^4$
NIC^{FL}		$4.0\times10^6 \pm 1\times10^5$
	RAM Ankyrin NLS OPA PEST	

图 6.11　蛍光素酶报道系统检测不同的 mN1^{IC}截短体对 RBP-J 反式活化能力的影响(Schroeder et al. 2000)

6.7.4　常规活化 mNotch1 并不封闭 G-CSF 诱导的分化

6.7.4.1　研究策略

已有研究显示，常规活化 mNotch1 将封闭 G-CSF 诱导的 32D 细胞的分化。为确定这是否是病毒载体和转染方式的影响，用逆转录病毒表达 MT-mN1-ICΔOP(myc 标签与 notch 的胞内 OP 段融合表达)，并以仅有 myc 标签表达的 LXSN-MT 为对照，二者都通过 G418 抗性筛选获得稳定株。再进行诱导分化(+G-CSF-IL-3)观察细胞表型的变化。

6.7.4.2　实验方法

(1) 稳定转染和筛选：32D 细胞分 3 份分别以 10μg rNERTneo 或对照质粒 rneo 电转染，并转移到 5ml 生长培养基中。转染第 2 天，通过添加 0.5mg/ml G418 进行筛选。第 8 天，G418 的浓度提高到 1mg/ml，在第 13 天进一步提高到 1.5mg/ml。在转染 18 天后，所有的细胞都是 G418 抗性的并进行了冻存。重新复苏后，通过软琼脂克隆建立单个细胞系，具体方法为：100 个细胞接种在 6 孔板中，每孔含 3ml 生长培养基及 1.5mg/ml G418 和 0.33%的 bacto 琼脂；9 天后，吸出单克隆，转移到液体培养基中，扩增 11 天并将单细胞系冻存；从转染到单细胞系的冻存共 38 天。随后根据标准步骤将 LXSN-MT 和 LXSN-MT-mNotch1-ICΔOP 病毒悬液从产毒细胞株中收集出来。32D 细胞在存在 IL-3 的条件下通过与病毒悬液共孵育 12h 进行感染，再通过筛选和克隆培养，在感染 37 天后分析分化情况。

(2) Western 印迹分析：细胞以细胞裂解液裂解。收集细胞提取物并在 4℃、20 000*g* 离心 10min。在 Western 印迹分析时，每 4×10^5 个细胞的蛋白质提取物在一个泳道上进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，并按标准步骤转印到 PVDF 膜上，同时以彩虹 Marker(10μg)作为分子质量标准。NERT 蛋白以抗人雌激素受体α的鼠单克隆抗体进行检测，连接标签的 notch 蛋白以抗 flag 标签或抗 myc 标签抗体检测，全长的 mNotch1 则利用 mNotch1

的胞内结构域单克隆抗体进行检测。检测到的蛋白质通过增强型化学发光系统(ECL)显像。

细胞裂解液：PBS、10mmol/L EDTA、1% Triton X-100、50mmol/L 氟化钠、1mmol/L 钒酸盐、9.5μg/ml 抑肽酶、1mmol/L PMSF、2μg/ml 抗木瓜蛋白酶、2μg/ml 白胃素、2μg/ml 胃酶抑素 A、2μg/ml 胰凝乳蛋白酶抑制剂。

6.7.4.3 结果判断

11 天后，以 32D 细胞为对照，约 50%的细胞发生终末分化；而 MT-mN1-ICΔOP 的 6 个克隆中仅有 2 个发生与对照相似的分化，2 个不分化，1 个分化延迟，1 个提早分化，而它们的 notch 的表达已通过 Western 印迹验证(图 6.12)。因此，虽然说异常的 mN1IC 活化表达能产生被封闭分化的细胞系，但不是常规现象，可能需要其他的改变。

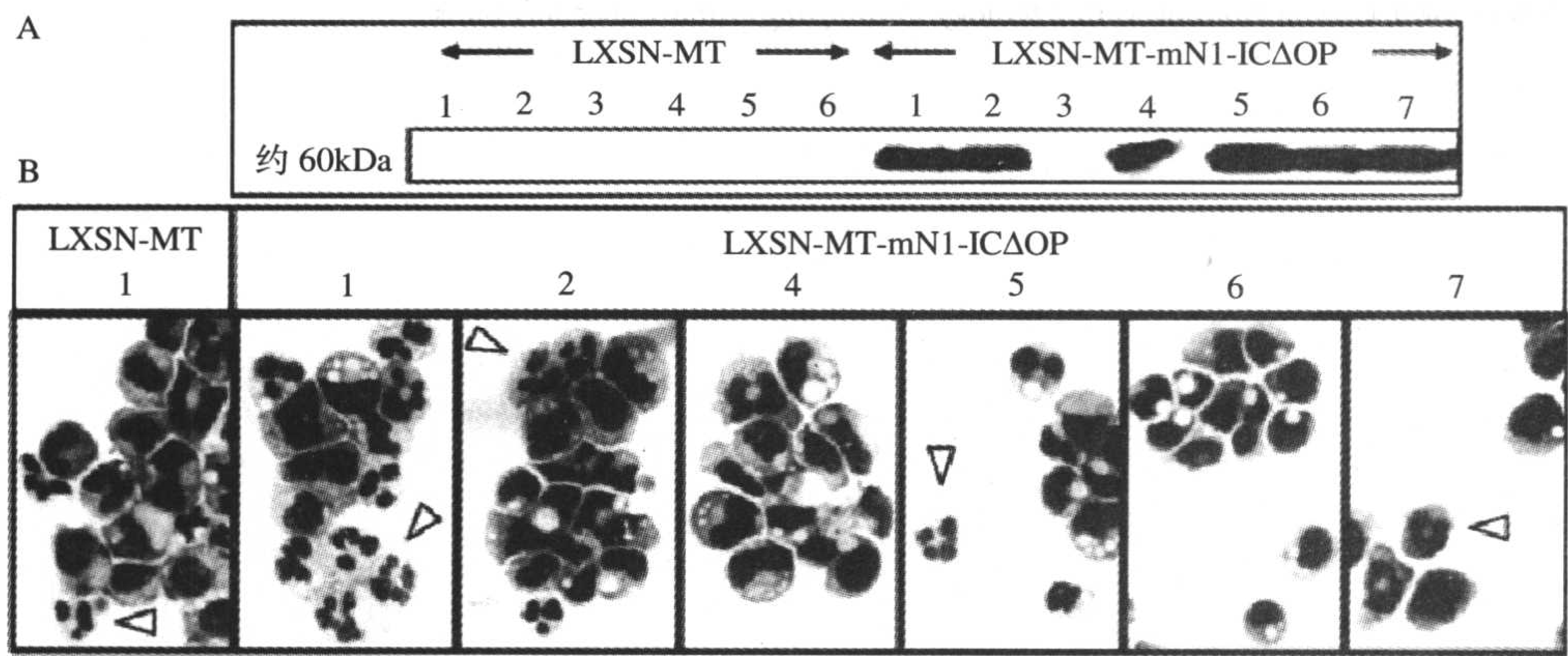


图 6.12 notch 表达对细胞分化的影响检测(Schroeder et al. 2000)

A. Western 印迹验证 MT-mN1-ICΔOP 克隆中 notch 的表达；

B. 染色验证 MT-mN1-ICΔOP 克隆的分化的不规则表现

(谢小燕)

主要参考文献

奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 RE 等. 1998. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社

陈晓红, 李明刚, 刘强. 2002. 真核生物转录调控——概念、策略与方法. 北京: 科学出版社

刘智广, 陈镔复. 1992. 蛋白质酸水解方法的改进. 第四军医大学学报, 13(3): 231~233

鲁茁壮, 王立生, 吴祖泽. 2004. Notch 信号通路研究进展. 生理科学进展, 35(2): 135~138

鲁子贤. 1982. 蛋白质化学. 北京: 科学出版社

牛立文. 1998. X 射线晶体学方法在结构生物学中的应用. 北京: 中国科学技术出版社

司徒镇强, 吴军正. 1996. 细胞培养. 世界图书出版公司

斯佩科特 DL, 戈德曼 RD, 莱因万德 LA. 2001. 细胞实验指南. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社

孙大业等. 2001. 细胞信号转导. 北京: 科学出版社

王冬梅. 2003. $Lin^-CD_{34}^-$细胞 cDNA 消减文库的构建及 *Humanin* 基因对 K562 细胞的抗凋亡效应研究. 博士论文

翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 2000. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社

Brymora VA, Robinson PJ. 2004. Current protocols in cell biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Carey M, Smale ST. 2000. Transcriptional regulation in eukaryotes: concepts, strategies and techniques. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP et al. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 6025~6030

Frohman MA. 1995. Rapid amplification of cDNA ends.In PCR Primer:A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 381~409

Kay BK, Castagnoli L. 2003. Current Protocols in Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Kensal E van, Holde W, Curtis J et al. 1998. X-ray diffraction. Chapter 6. Principles of Physical Biochemistry. Prentice-Hall.Inc.

Pagano M. 2000. 细胞周期——材料与方法. 张世馥译. 北京: 人民卫生出版社

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 2001. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社

Schroeder T, Just U. 2000. Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. EMBO J, 19(11): 2558~2568

Timm S, Ursula J. 2000. Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. EMBO Journal. 19(11): 2558~2568

Wei L, Altman RB. 1996. Recognizing protein binding sites using statistical descriptions of their 3D environments. In: Proc of the Pacific Symposium of Biocomputing. 497~508

Yamada KM. 1999. Current Protocols in Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press

第7章 核移植技术

7.1 总论

7.1.1 核移植技术的概念及基本原理

核移植(nuclear transplantation, NT)技术就是将动物早期胚胎卵裂球或动物体细胞的细胞核移植到去核的(同种或异种)受精卵或成熟的卵母细胞细胞质中，从而获得重构卵，并使其恢复细胞分裂，继续发育为与供体细胞基因型完全相同的后代的技术(Fulka et al. 1998)。核移植技术最早是为了研究细胞核的全能性和发育过程中细胞核与细胞质的相互关系而建立的，由德国胚胎学家 Spemann 于 1938 年首次提出。哺乳动物的核移植研究始于 1969 年，直到 1983 年，McGrath 等(1983)才建立了一套较为成熟的方法并成功地获得了克隆小鼠。1997 年，英国罗斯林研究所 Wilmut 等首次通过核移植技术克隆成功了以成体绵羊乳腺上皮细胞为核供体的山羊“Dolly”，证明了高度分化的体细胞仍具有全能性，在全世界掀起了轩然大波，并成为生物学发展史上一个重要的里程碑(Wilmut et al. 1997)。Wilmut 等建立的一整套绵羊体细胞核移植程序，如恢复体细胞核全能性的“血清饥饿法”，体细胞传代阶段确定以及体细胞克隆后代与亲本核供体间的 DNA 微卫星分析技术成为全世界同行公认的哺乳动物体细胞核移植技术的基本程序(Wilmut et al. 2003)。

核移植技术的发展按照供体核的来源不同经历了 4 个阶段：①胚胎细胞核移植，即以早期胚胎细胞为核供体，以去核卵母细胞或去核受精卵为胞质受体，这种技术已在多种动物实验中获得成功；②连续细胞核移植，即以早期胚胎为核供体，经核移植获得的早期胚胎再作为核供体进行多代克隆；③体细胞核移植，即以体细胞为核供体，以去核卵母细胞或去核受精卵为胞质受体，Dolly 羊的克隆成功即属于这种情况；④异种细胞核移植，即以体细胞为核供体，以异种去核卵母细胞或去核受精卵为胞质受体。

从目前来看，体细胞核移植主要有两条技术路线：罗斯林技术(Wilmut et al. 1997)和檀香山技术(Wakayama et al. 1998)。与以往的技术相比，前者的突破主要在于，采用血清饥饿即休眠法，使培养细胞暂时性地退出增殖周期，使供体细胞核处于 G_0 期，以保证供体细胞核与受体细胞的细胞质发育同步化；同时采用电脉冲法使供体核与去核的卵母细胞融合并激活卵母细胞。后者则在前者的基础上略有改动，直接采用 G_0 期或 G_1 期的体细胞为核供体，避免了血清饥饿；供体核注入后在卵母细胞质中停留一段时间(6h 左右)再激活。

核移植技术所依赖的理论基础是来源于同一胚胎或细胞系的所有细胞核都含有与受精卵完全相同的遗传信息，从基因组成上应该具有与受精卵一样的指导个体发育的全部潜能。当供体核移植到受体胞质后，供体核会在胞质因子的作用下，发生重新编程(reprogramming)，从而回到合子核的状态，指导重组胚发育成一完整的个体。核移植技术揭示了细胞质对细胞核的巨大影响作用，增进了对细胞分化、细胞全能性等发育生物学基本问题的深入认识；哺乳动物核移植的成功说明已经高度分化的体细胞核仍具有发

育全能性(totipotency)，即能够重新编程，并指导早期胚胎细胞发育成新个体。

7.1.2 核移植技术的主要应用

随着核移植技术的不断进步，目前它的主要应用在于：①为医学科学研究提供核基因型完全一致的实验动物，有利于科学家们研究目前尚未找到有效治疗方法的疾病，并揭示发病机制；②治疗性克隆，即通过核移植技术，以患者的细胞为供核体构建重组胚胎，然后从重组胚中获取与患者遗传背景相同的胚胎干细胞，最后诱导分化成血液细胞、胰腺细胞、神经细胞、心肌细胞等；这些细胞可用来为白血病、糖尿病、帕金森综合征、老年痴呆、脑中风、心血管疾病等疾病提供细胞治疗的基本条件，并可从根本上克服免疫排斥反应；③核移植技术在动物育种和拯救濒危动物方面具有广泛的应用价值，尤其是应用体细胞核移植技术生产转基因动物来制备高效表达外源基因的各种生物反应器，从而使克隆成功的实验动物变成了制药工厂，这为医药蛋白质的生产提供了一条经济有效的途径。

7.2 核移植操作所需的主要设备与试剂

7.2.1 核移植需要的材料和设备

显微锻针仪(配置 10×和 20×物镜，包括加热及冷却元件、玻璃固定夹和立体显微镜组合)、铂铱丝、拉针仪(在玻璃丝和控制的选择上有不同的变化)、玻璃毛细管[分别用于持定针(1×90mm)，去核或注射针(外径 1.2mm，内径 0.90mm)，以及穿刺针(10μl)]、显微操纵器、倒置显微镜、电融合系统、显微镜加热/冷却板、CO_2 培养箱、压电微移液管驱动单位、操作小室、转移移液管、27 号针、30mm 培养皿。

7.2.2 培养基及试剂

操作用培养基：M2 培养基(附录 4)，体外培养用的培养基，M16 培养基 (附录 6)，透明质酸酶，终浓度 300 单位/ml 的 M2 培养基。

显微注射用的培养基：显微注射时可用 HEPES 缓冲的培养基，如改进的 BMOC-3 加 HEPES(附录 4 中的配方)再补加细胞松弛素 B(5μg/ml)。如果注射时卵膜被拖带进细胞质中，卵将可能很快裂解。细胞松弛素 B 在注射期间使膜变硬且防止卵裂解。另一种效果也类似的方法是用 7%(*V/V*)乙醇。用平台冷却装置将温度降至 10℃，也能使卵膜变硬。只要在约 45min 内将卵再回升到 37.5℃，将不改变卵的存活。冷却效应使卵膜明显变硬需要长达 10min，因此最好采用更简单的细胞松弛素 B 的方法。

细胞骨架抑制剂：细胞松弛素 B，诺考达唑(nocodazole)；储存液(1000×)用二甲亚砜配制，保存在-20℃或溶解后马上冷至 4℃。

0.25% 胰蛋白酶：用含 0.02% EDTA 的磷酸缓冲液的生理盐水(PBS)配制，用于分裂球和细胞的消化。

灭活的仙台病毒，石蜡油，Hoechst 33342[储存液(1mg/ml)用双蒸水配制]，

Zimmermann 细胞融合培养基(附录 2)，0.3mol/L 甘露醇，芽肠霉素(aphidicoline)(储存液(1mg/ml)用 DMSO 配制，保存在-20℃或溶解后马上冷至 4℃)，PVP(聚乙烯吡咯烷酮)，PVA(聚乙烯醇，在进行直接注射时，PVA 代替 BSA 可防止细胞质内含物黏住供体细胞)，补加锶的培养基(附录 3)，补体[分离内细胞团(ICM)时用]，细胞增殖试剂盒(用于检测同步化胚胎的细胞周期试剂盒)，超排卵用激素，PMSG(孕马血清促性腺激素)和 HCG(人体绒毛膜促性腺激素)。

7.2.3　核移植技术流程必备的主要仪器

主要仪器包括荧光倒置显微镜和显微操作仪。不同配置的显微镜，都应具有很好的差分干涉反差(differential interference contrast，DIC)。一般用 180~400 倍放大，通常显微操作的放大率为 200×时才需要 DIC。此外还有细胞融合仪、拉针仪、锻针仪和磨针仪。有关装置具体描述如下。①持针架。显微操作器厂家都提供一些持针架或管周颈圈套件。例如，Leica 的持针架即为一种管周颈圈套件，将装有适配垫圈的两个黄铜配件固定，形成紧密的连接。在该组件盖有一金属螺纹帽，可对所环绕的注射针加以调节，形成一个防漏垫圈。垫圈直径应该与注射针的外径相匹，并需要经常更换，使所用的管子有效。②显微操作仪的调节装置。显微操作仪具有一些可调的刻度盘，用以调节操纵杆的灵敏度和张力。对显微操作仪上所进行的各种调节，应该请教合格的技术人员示范。③抗震台。在显微注射针插入到卵中时，轻微的震动也会使卵受到破坏，使之裂解(即时的或延时的)以及使前核的定位造成困难。为避免这种失误，必须使用无振台。例如，抗振基座支撑起在 4 个氮气传动活塞上的不锈钢覆盖的铅框(或复合物或钢框)。除此之外，大多数情况下，大理石台也很不错，而且价廉。在特定情况下，实验室的位置与环境也将有一定影响作用。

进行细胞核移植时，需要 3 种类型的玻璃工具：持定针、去核或注射针和细玻璃针。持定针可在显微手术时将卵细胞把持住，去核针用来去除卵母细胞或合子的染色体或细胞核，注射针用来注射供体细胞或细胞核到卵周隙或卵质中，细玻璃针用来切割透明带以进行细胞核移植。在器械的品质材料方面：持定针要用厚玻璃管来制作。用手将毛细管的变细部或中央在火焰上加热，然后迅速拉伸。用来持定卵时，最合适的外径是与卵的直径(80~100μm)等同或稍大。可在显微镜下检查针尖是否平坦或外径是否合适。在显微镜下有助于观察并通过配有铂铱丝(100μm)的锻针仪来将之定型。在锻针仪上将玻璃毛细管垂直于铂铱丝固定，稍稍进行加热。由于玻璃的熔化，玻璃毛细管末端会变小，末端结果稍稍弯曲到 30°。而细玻璃针的制作可将毛细管的变细部或中央在火焰上加热，然后用手迅速拉伸。为使针变得锋利，将玻璃毛细管垂直于铂铱丝固定，在铂铱丝加热温度较低时，将毛细管尖向下拉。此步重复 2~3 次即可使毛细管尖变得很细。

所有显微工具都可将末端稍与加热丝接触即略变弯曲(约距尖端 1mm)，要看所用的显微操作器的要求，更弯的也可在火焰上用手来做到。去核针核注射针要用薄壁玻璃管来制作。玻璃毛细管先用拉针仪拉，最后用锻针仪定型。将玻璃毛细管与铂铱丝成水平方向固定，将外径为 10~20μm 的毛细管末端轻轻接触到铂铱丝末端上的玻珠，慢慢加热，毛细管末端开始熔化，形成很细的玻璃针头。注射针合适的外径应与供体细胞的直径相

似或者稍小。

7.3 核移植技术的主要操作步骤

核移植技术主要包括显微操作技术和细胞融合技术，其中包括一系列复杂的程序：受核细胞的准备、去核、供核细胞的准备、细胞核移植、融合及激活、重构胚的体外培养和胚胎移植等。成功的核移植依赖多种因素，包括受体细胞的类型、受体细胞的来源、重构的方法、激活、胚胎的培养、供体细胞的类型、供体和受体细胞周期的选择等。下面按操作流程逐一介绍。

7.3.1 受核细胞的准备

迄今为止，哺乳动物核移植中用作核受体的主要有去核成熟卵母细胞和原核受精卵。以去核卵母细胞为最常用。现在越来越多的人将体外成熟卵母细胞(MII 期)用作受体胞质。

7.3.1.1 以成熟卵母细胞为受核细胞

MII 期卵母细胞是目前采用较多的核移植受体，只是各个实验室所采用的激活时间有所不同(移核前激活、移核时激活、移核后延迟激活)，无论是早期胚胎卵裂球、胚胎干细胞(embryonic stem cell，ESC)，还是体细胞的核移植到这类受体中均可成功获得了后代。

成熟卵母细胞的获得的途径有两种：体外成熟和体内成熟。体内成熟是用超排卵的方法获得。而体外成熟培养既方便又利于大量获得，体外培养的卵母细胞又有几个来源：①直接由卵巢上有腔卵泡抽取或剥离；②由腔前卵泡培养获得；③冷冻保存的卵母细胞。目前广泛使用的是前者，后两者则为卵母细胞提供了更为广阔的来源。

7.3.1.1.1 卵巢的采集及卵母细胞的分离

目前动物卵巢主要来自大型屠宰场，采集卵巢前应先将无菌生理盐水加热到稍高于预定温度(如 38~39℃)，在出发前倒入预先灭菌的保温瓶中，加入一定浓度的双抗(青霉素 100U/ml；链霉素 100U/ml)。采集卵巢时要尽量减少对卵巢的污染，动作要快，放入保温瓶前先用温生理盐水冲洗。摘取完卵巢组织后，应用加双抗的生理盐水保存卵巢，实验证明卵巢在 30~38℃保存 4h 以内最为理想。卵巢的保存温度和时间在不同程度上影响着以后 IVF(*in vitro* fertilization，试管受精)的囊胚发育率，卵巢在 33~35℃保存 8h 以内并不会减弱卵母细胞的体外成熟能力。卵丘卵母细胞复合物(cumulus oocyte complex，COC)有剥离法和抽取法两种分离方法。抽取法简便快速，目前应用较多。

带回实验室后，用灭菌温生理盐水或 PBS 冲洗，然后在超净台内分离卵母细胞。用抽取法时，选择 12 号灭菌针头，抽取前先吸一些卵母细胞洗涤液于注射器中，抽取液注入洁净无菌离心管中。在整个过程中要保温，尽量减小温度变化。卵巢的采集及卵母细胞的分离过程最容易受到污染，所以应尽量保证操作过程中的无菌性。

7.3.1.1.2 通过超排卵获取卵细胞

以小鼠为例，细胞核移植受体合子可从杂交小鼠(C57BL/6xCBA 或 C3H)收集，成熟的雌鼠(6 周)通过间隔 48h 注射孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin，

PMSG)5U 和人绒膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG)5U 进行超排卵，与同品种的雄鼠交配后，收集输卵管。在注射 HCG 20~22h 后，用 27 号针头从切出的输卵管收集合子。将收集到的 COC 用透明质酸酶(300NF 单位/ml)在 37℃下处理 1~3min，使卵与卵丘细胞解离开。用移卵针吸取裸露的 1 细胞卵，并用 M2 培养基洗 3 遍。选取具有两个前核和第二极体的 1 细胞卵用 M16 培养基在 5% CO_2 的培养箱中保温。

超排卵注射 HCG 42~44h 后，用 M2 培养基冲洗输卵管，从雌鼠的输卵管收集 2 细胞期胚胎。4 细胞和 8 细胞胚胎则从体外培养的 2 细胞胚胎收集，后者时在注射 HCG 后 65h 从输卵管和子宫角冲出。紧束化的桑葚期胚胎是通过 8 细胞期胚胎体外培养 24h 后获得。收集的胚胎温育在 M2 培养基中待用。

7.3.1.1.3 卵母细胞的成熟培养

将抽取液倒入平皿中检卵，从卵巢表面 26mm 卵泡内吸取 COC，选取卵丘细胞完整、细胞质均匀的 COC，用平衡好的培养液洗涤几次后，放入成熟培养液中。于 CO_2 培养箱内，5% CO_2 浓度，38.5℃进行体外成熟培养 18~24h，检查成熟率。

成熟培养液成分为含有 10% FBS、0.2mmol/L 丙酮酸钠、0.1mmol/L 谷氨酰胺、5μg/ml FSH、0.3IU/ml LH(黄体生成素)、1μg/ml 雌二醇以及 25μg/ml 庆大霉素的 TCM199-HCO_3(含 Earle 氏盐)。培养条件为 38.5℃、5% CO_2 相对湿度。

卵丘细胞发散呈放射状是卵母细胞成熟的一个标志，用吸管吹打去卵丘细胞，然后在显微镜下观察极体排出情况。将成熟的卵母细胞放入 0.1%透明质酸酶的管内振荡 2~3min，再用玻璃管轻轻吹打，使卵丘细胞与卵母细胞完全脱离，选择形态完整、细胞质均匀并排出第一极体的卵母细胞为体细胞核受体。

7.3.1.1.4 卵母细胞的冷冻与保存

卵母细胞用冷冻保护剂平衡处理，以 1℃/min 的速度降温至−5~−7℃，植冰，然后以 1℃/min 的速度降温至−30~−40℃，投入液氮。以 25℃/min 以上的速度解冻，解冻一般在室温或 37℃进行。

7.3.1.1.5 受核细胞细胞周期同步化的处理

在 M 期卵母细胞用作受体细胞质时，供体胚胎的细胞周期必须同步在 G_1 期、G_2 期或 M 期，因为 MII 期卵母细胞细胞质中具有高活性的卵成熟促进因子(maturation promotion factor, MPF)。当供体细胞与 MII 期卵母细胞融合时，由于卵质中的 MPF 活性而提早发生染色体浓缩。染色体浓缩过程中卵母细胞内的供体核被激活时，核膜则在细胞周期的 G_1 期初始再度形成，开始形成前核样的结构。如果与 MII 期卵母细胞融合的是 S 期的供体细胞，由于染色体浓缩及其后的激活，DNA 将发生异常。因此，供体细胞必须处在 G_1 期、G_2 期或 M 期。同步到 G_1 期后，培养基必须补加芽肠霉素直至与卵母细胞质融合。如果供体细胞处在 G_2 期，则激活后极体的排除是必需的。

1) 4 细胞至桑椹期胚胎

小鼠 2 细胞期着床前胚胎的细胞周期同步到 M 期的方法已经成熟，并无不良影响。但若需将胚胎细胞周期同步到 4 细胞期时，则 2 细胞期胚胎需在补加诺考达唑(3μg/ml)的 M16 培养基中温育 12~14h，然后用补加芽肠霉素(5μg/ml)的 M16 培养基来清洗和培养，以抑制 DNA 的合成。两个分裂球的分裂都同步发生在撤除诺考达唑后大约 55min。当桑椹期胚胎需同步在 G_1 期时，8 细胞期胚胎则用含诺考达唑的 M16 培养基处理 6h，

然后用补加芽肠霉素的培养基温育。在 4 细胞期的细胞核用作供体时，则用去核针插到每个分裂球的卵周隙来去除核质体。当分裂球小而难于去除核质体时，如在桑椹期胚胎中，则除去透明带，在胰蛋白酶-EDTA 溶液中用针将分裂球拆解成单个分裂球。拆解后的分裂球在室温下保持于补加芽肠霉素的培养基中待用。

2) *囊胚的内细胞团(inner cell mass，ICM)和腔壁滋养外胚层细胞*

囊胚可从自然交配 4 天后的雌鼠回收或者从桑椹期胚胎培养 24h 获得。用补加诺考达唑(3μg/ml)的 M16 培养基体外培养 12h，囊胚则同步到细胞周期的 MII 期。同步到 MII 期后，囊胚在不加诺考达唑而补加芽肠霉素(5μg/ml)的 M16 培养基培养 1h，以抑制 DNA 的合成。除了处于 G_1 期的外，囊胚的透明带均用乙酸 Tyrode 溶液或蛋白酶来去除。

囊胚的 ICM 通过免疫外科来分离：在 37℃下，将囊胚用适当浓度的抗小鼠肝脏和肾脏的多克隆抗体处理 30min。然后用 M2 培养基洗 3 遍，再转移到补加补体(低毒的豚鼠补体)的培养基(1∶7)37℃下处理 30min。到这一步，滋养外胚层(trophectoderm，TE)破损而分离出 ICM 细胞。

在制备小鼠的 TE 细胞时，无透明带的 G_1 期囊胚则进一步培养在补加芽肠霉素(5μg/ml)的 M16 培养基中，直到回收囊胚腔。小鼠的 TE 细胞通过免疫外科来仔细分离。

分离的 ICM 和小鼠的 TE 细胞用含胰蛋白酶(0.01%)和 EDTA(0.02%)或胶原酶(200U)和 DNA 酶(10μg/ml)的 PBS 在 4℃下处理 30min，以拆解为单个的细胞。

3) *细胞周期的确定*

为确定供体分裂球是否处在细胞周期的 G_1 期，可以用胸腺嘧啶类似物 5-溴-2′-脱氧嘧啶嘌呤(BrdU)掺入法。若 BrdU 掺入到细胞核，则细胞核就已经进入 S 期。因此，细胞核中 BrdU 存在表明细胞是否已停止在 G_1 期。将可能处于 M 期的胚胎在加有芽肠霉素(5μg/ml)和 BrdU 的 M16 培养基中培养 4h。培养末期，胚胎用酸性乙醇固定，在室温下与抗 BrdU 的单克隆抗体温育 1h。胚胎经过洗涤后在室温下用过氧化氢酶抗鼠 $IgG_{2\alpha}$ 处理 30min，用底物和增强剂处理，在二氨基联苯胺存在下进行观察。作为阳性对照，将可能处在 M 期的胚胎在含 BrdU 而不补加芽肠霉素的培养基中培养。做反染时，用 0.5%伊红染 2~3min。在 S 期的 BrdU 阳性细胞染成蓝黑色。

7.3.1.2 去核

7.3.1.2.1 卵母细胞去核

卵母细胞成熟后要去掉原有细胞核或使其丧失功能，分去核和灭能两种方法，目前多采用显微去核。成熟卵母细胞去核是核移植技术中的一个重要环节，要求去得干净，又尽可能的减少对细胞质的损伤。卵母细胞去核主要以显微手术操作去核为主。主要包括：①盲吸法：用微细玻璃管在第一极体下盲吸，吸出第一极体及处于分裂中期的染色体和周围的部分细胞质。②负压吸取法：在微分干涉差倒置显微镜的高分辨率视野下使卵母细胞轻微旋转，当纺锤体与焦平面垂直时核区与胞质的折光率略有差别，可准确吸出细胞核和少量细胞质，去核率可达 100%。③挤压法：于近第一极体处的透明带作一切口，用移核管挤压卵母细胞，使第一极体和附近 1/3 的胞质挤出透明带。此法与细胞分裂相有关，必须在恰当的时间进行，否则不能将染色质去干净。④半卵法：切开透明带，将一半细胞质吸出并移入另一个空透明带中，在倒置显微镜下用 10×目镜和 20×物

镜观察裸露的卵母细胞时，可看到含 MII 期染色体的小膨胀区，所收集的 MII 期卵母细胞放在无细胞骨架抑制剂的 37℃的 M2 培养基中，对膨胀区旁透明带进行切割，透明带切割后，卵母细胞在含细胞松弛素 B(5μg/ml)的 M2 培养基中温育。细胞松弛素 B 处理后膨胀区就难于辨别。在透明带切割裂缝的对面将卵母细胞持定，将去核针通过裂缝插入到卵周隙。去核针触及卵质时，含 MII 期染色体的半透明区域会随着移动，然后将该区域吸进去核针，同时通过肉眼确定染色质的存在。在将所有的卵母细胞去核后，用 M2 培养基将这些卵洗涤，在室温或 37℃孵育待用。

如果难于找到含 M2 染色体的区域，可先用 Hoechst 33342 染色，在进行去核时，可用荧光显微镜观察。具体方法是：将成熟培养 20~24h 的卵母细胞放入含 600IU/ml 透明质酸酶，无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 M2 液中，用玻璃微针将卵丘细胞吹打干净，选择第一极体已排出的卵母细胞(MII，中期)进行去核。卵母细胞用含 0.5μg/ml DNA 荧光染料(Hoechst 3342)，7.5μg/ml 细胞松弛素 B 的无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 M2 液在室温下染色 15~20min，然后用不含 Hoechst 33342 的 M2 培养基洗 3 遍。在荧光显微镜下用去核针将 M2 染色体除去(蓝紫，UV 激发滤光片 400~450nm)。UV 照射的时间对卵母细胞的存活力很关键，不应超过 15s。

此外还有功能性去核，即将受体卵母细胞置于 Hoechest 特异染液中，用紫外线或激光照射，使核丧失功能，但卵母细胞在紫外线照射时间不能超过 30s，否则其活力将受到严重损害。

7.3.1.2.2 合子去核

在显微手术前，将收集的合子在补加有细胞骨架抑制剂(细胞松弛素 B，诺考达唑)的 M2 培养基中保温。显微手术时，合子是利用显微操作器和倒置显微镜在操作小室内的一滴扁平的 M2 培养基中操作的。透明带用细玻璃针切割。合子通过持定针对透明带施加负压而持定。然后，将针尖小心向卵周隙推进，使卵质膜不致损伤。将细玻璃针叉住的合子从持定针松开，并在持定针壁反复靠压，直到产生一个切口。透明带切割后，用持定针在透明带切口的对面将合子持定。用去核针或注射针通过切口裂缝插入卵周隙。再将针尖进到两个前核当中的一个附近的一点。将一个前核连带少量的细胞质吸进注射针，另一个前核也重复这一步吸出，在这一步，为避免穿透卵质膜，有必要利用细胞骨架抑制剂。合子去核后，再用 M2 培养基洗，保持在室温下备用。

7.3.2 供核细胞的准备

7.3.2.1 体细胞作为供核细胞

目前已有多种体细胞作为核供体克隆成功的报道，包括羊乳腺上皮细胞、猪卵丘细胞、牛输卵管上皮细胞、牛耳成纤维细胞等。供体与受体细胞的细胞周期同步化是影响核移植成败的一个重要因素，其中大多数采用 G_0 期细胞。获取 G_0 期细胞的方法主要有两种：一是通过限制细胞培养基中的某种成分，从而使大部分细胞滞留在细胞周期的某一阶段，如用血清浓度递减的饥饿培养法使培养细胞暂时退出增殖周期；Wilmut 等就是利用血清浓度递减的饥饿培养法，即先将乳腺上皮细胞在含 10%胎牛血清(FCS)的培养基中培养，然后转入 FCS 含量仅为 0.5%的培养基中连续培养 5 天，从而使培养细胞暂时退出增殖周期。另一种可利用选择细胞类型的方法获得 G_0 期细胞，如刚排出的卵母细

胞其周围的卵丘细胞 90%以上处于 G_0 期。然而近来发现未经休眠诱导的 G_1 或 G_2 甚至 M 期供体细胞的核移植也均获得了成功。

供体细胞的获取：将组织块切碎，并用含 0.25%胰蛋白酶加 0.02% EDTA 的 D-Hank 缓冲液在 30℃下消化 30min，中间搅拌几次。用 D-Hank 缓冲液将消化的组织冲洗几次，用 100*g* 离心 5min，将上清液用 D-Hank 缓冲液冲洗几次，再将最终获得的上清液 700*g* 离心 10min 以获得细胞团块。将细胞团块悬浮于添加 10% FCS 的 DMEM 中置于 37℃、5% CO_2 的加湿培养箱中进行培养，经 10~14 天后，获得汇合的单层成纤维细胞进行传代，此后，细胞每 24h 传代 1 次。传代细胞数量足够以后进行冷冻、备用。在进行核移植前 3~10 天，将成纤维细胞放入含 0.5%血清的 TCM199 中进行血清饥饿法培养，以使其退出细胞周期并进入 G_0/G_1 期。用 0.25%胰蛋白酶加 0.02% EDTA 将培养皿中的细胞进行短时间消化，再用 TCM199 洗净，放入操作液中。

7.3.2.2 胚胎干细胞作为供核细胞

胚胎干细胞(embryonic stem，ES)是早期胚胎细胞或囊胚 ICM 细胞经抑制分化后培养而筛选出来的一类全能性细胞，这种细胞具有正常的二倍体核型，它既可以在特定条件下进行无限增殖而不发生分化，又可以在特定条件下分化为包括生殖系在内的各种细胞和组织。ES 细胞具有体外发育的全能性，并且可以在体外无限传代，因此，它是动物克隆的理想供体细胞。迄今为止，已经建立了小鼠和人的 ES 细胞系，利用 ES 细胞进行核移植的主要研究方向是利用这些细胞生产转基因动物，ES 细胞作为核移植供体细胞制备方法与体细胞的制备方法类似，也需进行细胞周期的调控。

从卵裂球中获取 ES 细胞的过程：先用胰蛋白酶消化卵裂球外面的黏蛋白层和透明带，再把胚胎放在含 0.25% 胰蛋白酶的 PBS 缓冲液中消化，用细玻璃管吹打，使细胞分散开。若要得到单个细胞，先把组织切成碎片，用含 0.25% 胰蛋白酶加 0.02% EDTA 的 PBS 缓冲液在 30℃下消化 30min，并不时加以搅拌，在 100*g* 离心消化液 5min 取上清，在 700*g* 离心上清 10min，获得粒状沉淀，用α-MEM+10% FCS 稀释沉淀，在 37℃、5% CO_2 下培养，备用。

胚胎干细胞维持的基本操作流程：

ES 细胞由四孔板传至 35mm 培养皿后，记为 0 代。一般 ES 细胞每 2~3 天以 1∶3 比例传代一次。培养 ES 细胞的培养皿在接种饲养层细胞前最好用 0.1%明胶处理。

(1) 去原培养基，加入 1.5ml PBS 洗 1 次。

(2) 加入 1.5ml 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液，消化 5min 后，加入含 15%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中和胰蛋白酶。

(3) 吸管轻轻吹打，直至成为单细胞悬液。

(4) 细胞悬液按 1∶3 的比例转移到新的含有饲养层的 35mm 细胞培养皿中，补加一些相同的培养基。

(5) 将细胞悬液摇匀后，置入 37℃、5% CO_2 培养箱中培养。

(6) 每日换液一次，若细胞长满可传代。

扼要地说，即是将 ES 细胞与事先用丝裂霉素 C(10μg/ml)灭活的小鼠原代培养的胚胎成纤维细胞共培养。ES 细胞目前还很难同步到 G_0 期和 G_1 期。可以将 ES 细胞的细胞周期

按 ES 细胞的大小来区分，M 期 ES 细胞呈圆形，易于区别。在用 M 期的 ES 细胞为供体细胞时，核移植后的卵母细胞发育至囊胚比例高，就同步到 M 期的 ES 细胞来说，在作为细胞核移植供体用之前，细胞培养要在含诺考达唑(3μg/ml)的培养基中培养 3h 后再用。

7.3.3 核移植

受体细胞和供核细胞准备好后，在显微操作仪的帮助下，就可以将分离的完整供体核移入受体细胞中。根据供体核移入到受体细胞不同部位，可分为带下注射和细胞质内注射，通常的核移植程序中，应用的卵母细胞外面包被透明带，但也有些学者采用无透明带的核移植方法。无透明带的核移植方法一般包括：①将卵母细胞切成两半；②在紫外光照射下选择无染色质的半卵，将包含母源染色体的一半胞质体丢弃；③将一个体细胞核与两个半卵融合；④单个核移植胚胎的体外培养。这种方法产生的核移植囊胚与具有透明带的核移植囊胚有同等的质量，也验证了一个被早期研究证实的观点：透明带对于胚胎的体外发育不是必需的。但这种半卵法有其缺陷，其一是浪费了 50%的卵母细胞胞质，其二是将三种不同的线粒体置于一个细胞内，增加了线粒体异质体的发生率。

将洗净的卵母细胞或从 $M16^{+}$ ET 培养液中取出的卵母细胞置于位于操作小室底部约 2μl 的 3SCOM 操作液中，室温预处理 5~10min。操作小室由载玻片和有机玻璃制成。在倒置普通光镜下观察，可见到卵细胞边缘有突起(突起部位下方为 M2 期核或纺锤体)。在此区上方用玻璃微针将透明带切开 1/4~1/5 的周长。用外径 22μm、内径 20μm 的注射针从切口处吸出包含少部分细胞质的 M2 期核(纺锤体)。在注射管中看到纺锤体与其他部位胞质明显不同，吸出的核质体中纺锤体也明显可辨。用注射针将吸出的 M2 期核(纺锤体)经透明带切口插入经去核操作的卵母细胞的透明带下，推出分离的纺锤体。完成大约 15 个重构卵后即进行下一步的电融合。显微操作在 22~24℃的室温中进行，大约 45min。一部分卵母细胞在含 5~10μg/ml 浓度的 Hoechst 33342 的无 CB 操作液中处理 10min，然后在紫外线(UV)下观察，检验 3SCOM 操作液处理的显示及去核效果。

核移植中尽管广泛地应用了人工激活的卵母细胞，但是由于缺乏诸如受精这些自然过程，受精卵的胞质环境仍然被认为优于卵母细胞，连续核移植就是为了弥补这一缺陷。它包括两个步骤：第一步是将 MII 期的卵母细胞与供核细胞融合，第二步是将其形成的原核移入到去核后的原核期的胚胎。后者的目的是使克隆胚体细胞来源的原核进入自然受精的原核阶段的胞质。

7.3.4 融合与激活

7.3.4.1 融合

由于移植过程中不可避免的机械损伤，因此必须在核移植后进行进一步融合处理，使重构胚融合，提高成活率。目前常用的是电融合法，其融合率较高。电融合是指把供、受体细胞放于有电融合液的电融合槽中，用电脉冲使两者胞膜穿孔而融合的过程。进行电融合处理时，要将待融合的供、受体之间的接触面与两个电极平行，要根据动物品种、供体细胞的直径和卵母细胞的成熟时间的不同来选择相应的电融合参数，直径越小，成

熟时间越长，所需的电脉冲强度越大，融合时间越长。

重构卵母细胞经 3 次 M2 培养基洗净后，直接放入电融合液进行电融合或在 CO_2 箱中培养 30min 后进行电融合。此时为 HCG 注射后的 16~18h。电融合采用平行不锈钢丝小室，电极直径 0.3mm，距离 0.6mm。电融合液为 0.3mol/L 甘露醇，含 0.1mmol/L $MgCl_2$、0.05mmol/L $CaCl_2$、0.05%的 BSA 和 0.5mmol/L HEPES。重构卵在 37℃预温的电融合液中平衡 3min 后移入两电极间，用手拨动使供体核与受体的接触面与电极丝平行。采用 160~170V/mm，20μs，间隔 1s 的 2 个脉冲进行电融合。融合后的卵母细胞经 $M2^-$培养基洗涤 3 次后移入 $M16^+$ ET 培养液中，30min 后观察，未融合的重构卵母细胞再进行第二次、第三次电融合。

调节待融合细胞在电场中排列方式有两种：一是采用交流电压形成的电场；二是采用手动方式。融合脉冲为直流电矩形波。不同动物间、不同融合条件下，要对电融合适宜参数做适当改动，对于较小的细胞与去核卵母细胞融合所需要的电脉冲强度，要高于较大的细胞融合所需要脉冲强度。而较高电脉冲强度对于大的去核卵母细胞作用太强，易导致裂解，因而对这些因素必须综合考虑。目前一般采用交流电场排列细胞的方向即交流定位，常用的频率为 600~1000kHz，电压为 5~6V，持续时间 5~10s。常用的直流电融合条件为 1.0~2.0kV/cm 的场强，30~60μs 的持续时间。目前报道体细胞核移植研究中，多采用相对较高场强(2kV/cm)和短脉冲(10~30μs)进行融合。

融合方法还可以通过化学试剂(如乙醇、钙离子载体、锶等)处理以提高核移植的效率。

7.3.4.2 激活

核移植中，因缺乏精子介导的受精，为了使克隆胚胎进一步发育，卵母细胞的人工激活是非常必要的。各种激活方法都是为了创造一个短暂的 Ca^{2+}的波动，作用于 Ca^{2+}信号途径下游通路能导致卵母细胞激活。但这个过程往往难以完全复制自然的过程，而只是导致细胞内 Ca^{2+}一过性升高。卵母细胞的激活对于克隆胚后续的发育有长久的作用。

电脉冲激活法：将重构的卵母细胞转移到载玻片上存有的 Zimmermann 细胞融合培养基的两根距离 1mm 电极丝的小室中。对重构的卵母细胞相隔 20min 施予的两个 50μs 的 50V/mm 电流(DC)脉冲。若供体细胞不融合，则先给予 AC 脉冲(100~150kHz，5V/mm)，再施予 DC 脉冲，或者人工而不是 AC 为供体细胞确定位置，使之平行于电极丝和受体卵母细胞之后，再施予 DC 脉冲。重构卵母细胞经过电脉冲后，在 M16 培养基中培养 5h，并查验在卵质中供体细胞核衍生的前核样结构的形成。

另外其他的化学试剂，如乙醇、Ca^{2+}载体、$SrCl_2$、放线菌酮、离子霉素等也能使卵母细胞激活。重构的卵母细胞培养于补加 7%乙醇的 M16 培养基中作用 7min 即可被激活，并形成原核，而且重组胚发育至囊胚时，细胞数目多，囊胚质量好。

7.3.5 重构胚的培养及观察

7.3.5.1 重构胚的培养

激活后，将重构的卵母细胞培养于 M16 培养基中 15~60min，并对融合进行核查，

融合的卵在体外培养 4 天，发育为囊胚期的胚胎，再移植入雌性受体体内，通过输卵管移植是在 0.5 天，子宫角移植则在 3.0~3.5 天。

哺乳动物的重构胚的培养有两种：①体外培养，即在适当的条件下培养到胚胎植入前的某个时期，然后进行胚胎移植(将复合活性化处理的移核重构胚洗涤 2 次，采用 CR2aa+10% FCS+10μl Insulin+100IU/ml 青霉素+100mg/L 链霉素培养液进行发育培养，168h 后观察移核重构胚的囊胚发育情况)；②采用中间受体培养，在核质融合后，将重构胚移入暂时的同种或异种受体动物的输卵管或子宫，几天后收集桑椹胚或囊胚进行形态学检测后，再重新移入假孕体子宫发育直到动物出生；或在囊胚形成后，再在定向诱导下向组织器官发育，最终应用于临床移植。

体外培养哺乳动物胚胎的主要障碍是发育阻滞，但不同的动物出现在不同的时期。研究表明，胚胎发育阻滞与基因组激活关系密切，多发生在胚胎卵源性基因调控向胚源性基因调控转化，即胚源性基因激活时期，因此推测发育阻滞可能与胚源性基因激活不全或激活失败有关。体细胞共培养系统能在一定程度上克服胚胎发育阻滞，其原因可能在于体细胞能产生促有丝分裂因子和细胞外基质成分，促进胚胎细胞分化，并可代谢或除去培养液中的胚胎毒性因子。

不同类型的体细胞的共培养效果是不一样的，一般采用输卵管上皮细胞和颗粒细胞。在进行兔的核移植研究时发现，在基础培养液相同的条件下，与胎儿成纤维细胞饲养层共培养，尤其是与同源胎儿成纤维细胞饲养层共培养，有利于重构胚的发育，尤其是有利于提高桑椹胚和囊胚的发育率。培养液主要有 TCM-199 和 CR1aa 等，在基础液的基础上再加其他因子。

7.3.5.2 重构胚的体外培养观察

激活后，核移植体再次洗净并放入 SOFaa 中培养，培养 24h 后观察初始卵裂情况，并在随后的 7 天里每隔 24h 观察一次发育情况。在胚胎发育的不同阶段，随机取出几枚重构胚胎用 Hoechst 33342(5μg/ml)染色以确认在每个胚胎的卵裂球中都有核，从而证明确实是移入的核进行了分裂而不是由于细胞质碎裂造成卵裂率偏高的假象。

7.3.5.3 数据处理

所有数据都用 χ^2 统计法进行分析，凡是 $p<0.05$ 都认为是差异显著。

7.4 核移植技术的注意事项及影响因素

7.4.1 影响核移植效率的因素及存在的问题

7.4.1.1 影响核移植效率的因素

(1) 受体细胞质：卵母细胞优于受精卵，且 M2 期的卵母细胞极体易于观察，染色体位于极体附近，易于去核。

(2) 供体细胞：选择供体细胞系的一个重要的标准是它能具有较高的单个细胞克隆效率。许多原代细胞的克隆效率是很低的。为使供体细胞核与受体胞质的细胞周期具有

较好的一致性，多选择 G_0 或 G_1 期细胞作核供体。

(3) 激活卵母细胞的方法：卵母细胞的激活可以由电刺激或化学方法诱导。通常采用化学物质锶来激活卵母细胞，锶可以刺激卵母细胞内储钙的释放，而这种内储钙的释放是受精后开始卵裂的信号。激活液中还含有细胞松弛素 B，可以抑制极体的形成。

(4) 核供体与受体胞质的融合方法：多采用电激融合的方法，因其融合的效率高，对胚胎的发育影响很小。

7.4.1.2 核移植技术存在的主要问题

目前核移植技术存在的问题主要体现在以下几个方面：操作损伤以及操作过程中有害物质的积累；妊娠的病理性改变引起胚胎期死亡；体细胞系建立困难，细胞的传代次数有限；核移植技术的实施费用巨大等，如克隆羊“Dolly”的制作费用超过 200 万英镑。因此，核移植技术相关的基础研究还需进一步深入，才可能从根本上降低生产成本，使该技术得到广泛的实际应用。具体存在的问题：

(1) 受核细胞的来源问题还没有真正解决。实践证明卵母细胞是目前的最佳选择，但是来源仍受到限制。

(2) 供核细胞的来源也仍未解决。现在的研究还没有证明是否所有的体细胞都适合用于核移植。某些类型的体细胞在核移植过程中基因可能发生了不可逆的转变，以至丧失再程序化的可能。

(3) 去核技术还不过关。目前使用的主要是显微操作去核，怎样既去的干净又尽量减少对细胞质的损伤仍是目前要解决的问题。

(4) 重构胚的融合与激活技术还有待于进一步研究。融合与激活是关系到重构胚能否发育的重要一步。

(5) 重构胚的培养技术也还在进行优化研究。有效的培养技术是提高重构胚发育率的必不可少的条件。

(6) 细胞核再程序化机制仍不清楚。例如，卵细胞质是如何调控或刺激细胞分裂的，它是如何重新程序性地开启细胞核基因表达的？供体核与受体的细胞周期是否必须要同步化？是否身体任何一种类型的体细胞的细胞核均可在卵细胞质中发育分裂等。

其他方面还包括：克隆动物是否带来单亲繁殖的更多缺点，是否有更多的发生遗传性疾病的可能性？因此，核移植技术还需分子生物学、遗传学及发育生物学等相关科学的进一步发展。

7.4.2 提高核移植成功率的措施

胚胎体外成熟、移植等技术不仅具有巨大的实用价值，而且在克隆过程中发挥了关键作用。这些技术的进步对核移植成功率的提高有很大的帮助。

(1) 进一步完善卵母细胞的体外成熟技术。核移植技术要达到广泛应用必须有一个前提，即卵母细胞体外成熟技术的完善。

(2) 克隆胚胎的体外培养。胚胎的培养需要严格的条件控制，因为培养条件对胚胎的质量影响很大，而且能改变发育相关的重要基因的表达模式，体外培养技术如果能得

到改进，使之对胚胎的发育没有影响，又能减少克隆动物的表型异常，则这一技术将更具优越性。

(3) 卵母细胞与核移植胚胎的冻存。卵母细胞的妥善冻存可使核移植实验不受地理和气候的影响。克隆胚胎的冻存将对核移植技术的商业化有很重要的作用，采用冻存的核移植胚胎已经产生了克隆牛，但这一技术还没有用于其他动物。

(4) 怀孕的维持与围产期护理。克隆胚胎移植后的怀孕识别和维持对于产生活的后代有很关键的作用。

7.4.3 核移植技术的负面效应

核移植技术虽然会给人们带来巨大的方便和经济利益，但也有其不良作用。克隆作为一种无性繁殖手段，没有双亲的基因组合，其性状上不会超过供体，更谈不上进化，这无疑是违背生物进化规律的，必将导致物种退化。

转基因克隆虽然改变了其基因型，但这种人为的改变会带来什么样的后果还在未可知之列；动物所有体细胞是否具有完全相同的基因型还并不清楚，核移植中带入的染色质会有什么影响也不清楚；转基因产品对人是否有不良影响也尚未知道；用转基因动物生产移植器官更是件冒险的事，这种移植可能使人对某些病毒敏感而导致严重的后果。所以加强核移植技术理论基础的研究，揭示核移植过程中重编程的内在规律和实质，将会极大地造福于人类，为人类的健康做出巨大的贡献。

(刘大庆　杨印祥　裴雪涛)

主要参考文献

卡尔 A 平克尔特. 2004. 转基因动物手册. 劳为德译. 北京: 化学工业出版社. 151~175

Fulka JJ, First NL, Loi P et al. 1998. Cloning by somatic cell nuclear transfer. J Bio Essays, 20: 847~851

McGrath J, Solter D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and fusion. Science, 220: 1300~1302

Wakayama T, Perry ACF, Zoccotti M et al. 1998. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature, 394: 369~374

Wilmut I, Beaujean N, Sousa P A de et al. 2003.Somatic cell nuclear transfer. Nature, 419: 583~586

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J et al. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 385: 810~813

第8章　基因打靶技术

基因打靶技术是建立在胚胎干细胞(embryonic stem cell，ES细胞)和同源重组基础上的定点改变物种遗传信息的实验手段。首先在体外利用同源重组技术获得带有预先设计突变的ES细胞，即中靶ES细胞，随后将这种遗传修饰的ES细胞注入囊胚，获得嵌合体，然后将嵌合体与野生型个体交配，若ES细胞已整合入生殖系，在子一代中会获得携带一条突变染色体的杂合子个体，最后通过遗传育种在子二代中获得携带两条突变染色体的纯合子个体。自1987年Thomas和Capecchi完成了世界第一例基因打靶实验以来，基因打靶技术已成为广泛使用的常规技术。

8.1　打靶载体构建

哺乳动物细胞中常用的两种载体是置换型(Ω型)载体和插入型(O型)载体。通常插入型载体的打靶效率比置换型载体高5~10倍(Hasty 1991)，但由于插入型载体在打靶时有许多拓扑构型，而且基因在靶位点处“复制”了一份，筛选中靶克隆比置换型载体要复杂，因此在基因打靶实验中更倾向于使用置换型载体。置换型载体通常包括与两段靶基因同源的脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid，DNA)片段，即同源臂，它们用于指导打靶载体和染色体上的靶基因序列发生同源重组。在同源臂之间有一个正选择基因，通常是*neo*基因，可以通过G418来富集稳定转染的ES克隆，当它插入或取代靶基因上游一个或几个编码外显子时，通常可使靶基因彻底失活。在同源臂的外侧通常还引入胸苷激酶(thymidine kinase，TK)基因作为负选择基因，在随机重组情况下，*TK*基因通常也插入到染色体中，因此可用丙氧鸟苷(gancyclovir)来杀死发生随机重组的ES克隆，使同源重组的克隆得到富集。构建打靶载体时要充分考虑中靶ES细胞的鉴定。如果用PCR方法鉴定，一侧同源臂的长度最好在3kb以下。如果用Southern印迹鉴定，要考虑探针和限制性内切核酸酶酶切位点的安排。

8.1.1　PCR方法获得同源臂序列

构建打靶载体首先要获得用于同源重组的同源臂序列。同源臂序列可以通过筛选小鼠基因组文库来获得，目前小鼠基因组测序已基本完成，因此可以通过更简单有效的聚合酶链反应(polymerase chain reaction，PCR)方法来获得。为了提高同源重组效率，同源臂序列最好来自于要操作的ES细胞品系(Rigle et al. 1992)，序列长度一般要求4~10kb(Deng et al. 1992)，因此采用能扩增较长片段的高保真DNA聚合酶进行PCR扩增。要考虑的影响PCR成功的主要因素有：

(1) DNA模板。DNA模板的完整性和纯度至关重要，其平均长度至少应该是预期的PCR扩增产物长度的3倍以上，OD_{260}/OD_{280}比值应在1.8左右，以使PCR抑制剂的含

量降至最低。

(2) DNA 聚合酶。现已有多家公司开发了适于扩增较长片段的高保真 DNA 聚合酶。笔者曾以 8.2.5 的方法提取的 ES 细胞基因组为模板，用 Stratagene 公司的 PfuUltra 聚合酶，用 Touchdown PCR 方法成功扩增了 4.2kb 的片段，测序后发现无一突变。用 TaKaRa 公司的 Pyrobest DNA 聚合酶进行巢式 PCR，成功扩增了 2.6kb 的片段，测序后也发现无一突变。

(3) 引物。引物设计的一般原则必须遵守。用于较长距离 PCR 的引物一般较标准 PCR 的引物稍长些(25~30bp)。两条引物的退火温度要大致相等。引物 5′端可引入合适的限制性内切核酸酶位点以便后续 DNA 操作。具体方法请按常规分子克隆方法进行。以下是笔者获取同源臂序列时使用的方法，仅供参考。

8.1.1.1 Touchdown PCR

冰上配制如下反应体系：

去离子水	37μl
10×PfuUltra™ HF 反应缓冲液	5μl
dNTP(每种 2.5mmol/L)	4μl
DNA 模板(100ng/μl)	1μl
引物 1(10μmol/L)	1μl
引物 2(10μmol/L)	1μl
PfuUltra™ HF DNA 聚合酶(2.5U/μl)	1μl
总反应体系	50μl

设置如下条件进行 PCR 扩增：

95℃、2min。

95℃、30s；引物 T_m −0.5℃/循环、30s；72℃、4min；共 20 个循环。

95℃、30s；引物 T_m −10℃、30s；72℃、4min；共 15 个循环。

72℃、10min。

8.1.1.2 PCR 产物的纯化

用 Promega 公司的凝胶和 PCR 纯化系统(Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Cat.# A9281)：

(1) 7%琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物。

(2) 在紫外灯下小心快速切下含目的片段的凝胶。

(3) 按每 10mg 凝胶加 10μl 的比例加入膜结合溶液(membrane binding solution), 50~65°C 孵育 10min，使凝胶完全溶解。

(4) 将 SV 柱子(SV minicolumn)置于收集管上，加入已溶解的凝胶混合物，室温放置 1min。

(5) 16 000g(14 000r/min)离心 1min，丢弃收集管中的液体，将柱子重新置于收集管上。如离心不能达到 16 000g(14 000r/min)将减少产量。

(6) 加入 700μl 洗膜液(membrane wash solution)，16 000g 离心 1min，丢弃收集管中

的液体，将柱子重新置于收集管上。

(7) 加入 500μl 洗膜液，16 000*g* 离心 5min，将柱子置于一新的 1.5ml 离心管上。

(8) 加入 50μl 无菌水，室温孵育 1min，16 000*g* 离心 1min，将洗脱液储存于−20℃备用。

8.1.1.3 PCR 产物加尾

取 1~7μl 纯化的 PCR 产物，加入 1μl 10×Taq DNA 聚合酶反应缓冲液(含 $MgCl_2$)、1μl 2mmol/L dATP、1μl Taq DNA 聚合酶，加水补足 10μl，70℃孵育 15~30min。

8.1.1.4 PCR 产物与 pGEM-T easy 载体的连接

pGEM-T Easy 载体为 Promega 公司产品(Cat.# A1360)。

(1) 使用前振悬 2×快速连接 buffer。

(2) 建立连接体系：5μl 2×快速连接 buffer，1μl pGEM®-T Easy 质粒(50ng/μl)，加尾后的 PCR 产物 *x*μl(与 pGEM®-T Easy 质粒的摩尔比为 3∶1~10∶1)，1μl T4 DNA 连接酶(3 Weiss 单位/μl)，加水补足至 10μl。

(3) 室温连接 1h。如需获得最多的转化子，请置于 4℃连接过夜。

(4) 取 5μl 连接产物用高效感受态细胞转化。

8.1.1.5 连接产物的转化

(1) 用常规氯化钙法制备感受态细胞。如达不到要求，可用清华天为时代公司的感受态细胞。

(2) 取 5μl 连接产物与 100μl 感受态细胞冰上混合，冰浴 30min。

(3) 42℃热激 90s，再置冰上 2~3min。

(4) 加入 800μl LB 培养基，37℃、150r/min 振荡培养 45min。

(5) 7000r/min 离心 2min，扔弃 800μl 上清，将余下 100μl 与沉淀混匀，均匀涂布于含有合适抗性的 LB 平板上。

(6) 37℃培养 16~18h，挑选转化子进行酶切和测序鉴定。

8.1.2 打靶载体构建

较长 DNA 片段之间的连接有时会成为体外 DNA 操作的障碍。以笔者的经验，采用 Promega 或 Qiagen 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 DNA 片段，采用 TaKaRa 公司的 DNA 连接试剂盒(DNA Ligation Kit Ver.2.1；Catalog No. D6022)进行连接，问题往往迎刃而解。

8.1.2.1 酶切与回收

用合适的限制性内切核酸酶酶切 2μg 含插入片段的 pGEM®-T Easy 质粒和打靶质粒。按上述方法从琼脂糖凝胶中回收插入片段和打靶质粒。

8.1.2.2 目的片段与打靶载体连接

用 TaKaRa 公司的 DNA 连接试剂盒。

(1) 按摩尔比3：1混合目的片段与打靶载体，总体积为5~10μl，加入等体积的溶液 I，混合均匀。

(2) 16℃反应 30min 后转化。加入 1/10 体积的溶液 III，可增强转化效率 2~5 倍。

(3) 37℃培养 16~18h，挑选转化子进行酶切和测序鉴定。

8.1.2.3 质粒提取

制备电穿孔转染用质粒，最好用 Qiagen Plasmid Midi Kit(Cat.No.12143)。由于插入了长同源臂序列，打靶载体的拷贝数有时会显著降低，此时应增大培养体积。

(1) 从新鲜划线平板上挑取一个单克隆，置于 5ml LB 中 37℃、300r/min 培养 8h。

(2) 取 100μl 培养物加入到含 100ml LB 的培养瓶中，37℃、300r/min 培养 12~16h。

(3) 4℃、6000*g* 离心 15min 收集细菌。

(4) 加入 4ml buffer P1 重悬细菌沉淀。

(5) 加入 4ml buffer P2，轻轻混匀，室温孵育 5min。

(6) 加入 4ml 预冷的 buffer P3，轻轻混匀，冰上孵育 15min。

(7) 4℃、20 000*g* 离心 30min，转移上清置一新的离心管中，4℃、20 000*g* 离心 15min。

(8) 往 QIAGEN-tip 100 柱子上加入 4ml buffer QBT，使溶液自然流干。

(9) 将上清加到 QIAGEN-tip 100 柱子上，使溶液自然流干。

(10) 用 10ml buffer QC 洗涤 QIAGEN-tip 100 柱子，重复一次。

(11) 用 5ml buffer QF 洗脱 DNA。

(12) 加 3.5ml 异丙醇沉淀 DNA，4℃、15 000*g* 离心 30min，舍弃上清。

(13) 用 2ml 70%乙醇室温洗涤 DNA，15 000*g* 离心 5min，舍弃上清。

(14) 空气中干燥 5~10min，用合适体积的 TE(pH8.0)缓冲液重悬 DNA，−20℃保存备用。

8.1.2.4 打靶载体线性化

采用线性化 DNA 能获得较高的同源重组效率(Hasty et al. 1992)。打靶载体在电穿孔转染 ES 细胞前要线性化，因此在设计打靶载体时，其中一个同源臂的末端应该有单一酶切位点。载体中通常选择 *HSV-TK* 基因作为负选择基因，如果 *TK* 基因在打靶载体的末端，常常会在转染过程中被破坏。因此最好在远离 *TK* 基因的一个同源臂能有单一酶切位点，这样，载体线性化后 *TK* 基因不会在末端。

酶切及乙醇沉淀方法请按常规分子克隆方法操作，以下流程供参考。

(1) 选择合适的限制性内切核酸酶在 400μl 体系内消化约 100μg 打靶载体。

(2) 取 2μl 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳确保完全线性化。(重要!)

(3) 加入 40μl 3mol/L 乙酸钠(pH5.2)和 1ml 无水乙醇，室温沉淀 10min。

(4) 12 000r/min 室温离心 10min，弃上清。

(5) 加入 1ml 70%乙醇洗涤沉淀(重要！离子浓度是影响电穿孔转染的重要因素)。

(6) 12 000r/min 室温离心 5min，在无菌超净台中小心弃上清，干燥沉淀。

(7) 加入约 50μl 无菌水重悬 DNA，−20°C 保存备用。

8.2 中靶 ES 细胞的筛选

中靶 ES 细胞筛选和鉴定的方法已经很成熟。以下是军事医学科学院生物工程研究所发育与疾病遗传学研究室已成功使用的方法。

8.2.1 小鼠胚胎干细胞的培养

8.2.1.1 制备原代小鼠胚胎成纤维细胞滋养层

STO 细胞株和原代小鼠胚胎成纤维细胞都可用于支持全能胚胎瘤(embryonal carcinoma，EC)细胞系和 ES 细胞系的生长。Suemori 和 Nakatsuji(1987)比较了 STO 和原代小鼠胚胎成纤维细胞对小鼠 ES 细胞的影响，发现原代小鼠胚胎成纤维细胞更适合于小鼠 ES 细胞的培养。从各种小鼠品系中分离的胚胎成纤维细胞在支持 ES 细胞生长的功能方面没有显著性差异。用于打靶实验的胚胎成纤维细胞必须具有筛选抗性，通常可从携带抗性基因的转基因小鼠或基因敲除小鼠中分离。

(1) 将怀孕 13.5~14.5 天的母鼠处死，打开腹腔，取出胚胎，放入无菌的直径为 90mm 的培养皿中。

(2) 去除卵黄囊、羊膜和胎盘，将胚胎在新鲜的 PBS 中洗 2 次。

(3) 用一对镊子将胚胎的头及内脏去除，用消毒剪刀将胎鼠剪成小的碎片(约 $1mm^3$)，加入 PBS 洗至液体基本无色。

(4) 将胎鼠碎片转移至含 PBS 的 15ml 离心管，1000r/min 离心 5min。

(5) 弃上清，加入 5ml 0.25%胰蛋白酶，37°C 放置 30min，加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，用吸管反复吹打。

(6) 为去除大的细胞团块，将细胞悬液流过 200 目筛网，然后 1000r/min 离心 5min。

(7) 弃上清，加入饲养层细胞培养基重悬细胞，将细胞悬液转移到 150mm 培养皿中，置于含 5%CO_2的细胞培养箱中 37℃培养 2~3 天，通常第 3 天胚胎成纤维细胞已长满培养皿。此时记作第 0 代(P0)。可将细胞用冻存培养基(15% FCS，10% DMSO，75% DMEM)按 2×10^6 个/ml 的密度冻存，待需要时再复苏，按 1：3 传代培养。

(8) 当第 4 代细胞长满时，更换新鲜的饲养层细胞培养基，加入终浓度为 10μg/ml 的丝裂霉素 C(mitomycin C)，37℃继续培养 2~3h 后使其停止生长。

(9) PBS 洗 5 次，0.25%胰蛋白酶消化，计数。

(10) 1000r/min 离心 5min，加入合适体积的冻存培养基，使细胞密度为 2×10^6 个/ml，用吸管吹打混匀后冻存备用。通常直径为 10cm 的培养皿需铺 1×10^6 个细胞建立饲养层。

制备 600ml 饲养层细胞培养基可参考以下配方：

DMEM	500ml
L-谷氨酰胺	6ml
非必需氨基酸溶液(10mmol/L，100×)	6ml

青链霉素溶液(5000U 青霉素，5mg 链霉素/100ml)	6ml
巯基乙醇	4μl
胎牛血清	90ml

用一次性过滤瓶过滤，置于4℃冰箱中备用。在此培养基中添加 1000U/ml 白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor，LIF)即可用于 ES 细胞的培养。

8.2.1.2 培养 ES 细胞所需的试剂

(1) 水：水的质量至关重要，推荐使用经 Millipore-Q 纯水系统过滤过的蒸馏水或购买的超纯水。

(2) DMEM：培养 ES 细胞的基本培养基主要采用高糖(4.5g/L)，含 *L*-谷氨酰胺(4.0mmol/L)的 DMEM 干粉培养基。培养基干粉溶于超纯水中，用 HCl 调 pH 至 7.2，然后用 0.22μm 的微孔滤膜过滤至无菌容器中。DMEM 也可使用购买的液体培养基，并能在 4°C 保存 2~4 个月。由于 DMEM 中的谷氨酰胺不稳定，容易降解，因此，在 DMEM 储存 14 天后，必须在 DMEM 中加入 2mmol/L 的谷氨酰胺。

(3) 0.1mmol/L 非必需氨基酸(100×stock)。

(4) 100μg/ml 青-链霉素。

(5) 200mmol/L *L*-谷氨酰胺(100×stock)。

(6) 15%特级胎牛血清：胎牛血清是影响 ES 细胞生长状况的重要因素。过高浓度的胎牛血清并不利于 ES 细胞的生长，不同批号的胎牛血清也具有不同的效果。因此，为了避免批次间差异，常选定一批适用的胎牛血清大量冻存于−20°C 以备用。可从血清供应商购买胚胎干细胞级胎牛血清，这些血清已经过筛选，对其维持 ES 细胞增殖而不分化的能力作了鉴定。

(7) 10^{-4}mol/L *β*-巯基乙醇(100×stock)：ES 细胞培养基中加入*β*-巯基乙醇，对胚胎细胞的分裂增殖有促进作用。某些 ES 细胞系，如 TC-1ES 细胞，对*β*-巯基乙醇具有依赖性，不加*β*-巯基乙醇，ES 细胞不能存活。

(8) 1000U/ml 白血病抑制因子(LIF)。

(9) 不含 Ca^{2+}和 Mg^{2+}的 PBS 缓冲液：1L PBS 的配制包括如下试剂，10g NaCl，0.25g KCl，1.44g Na_2HPO_4，0.25g KH_2PO_4，pH 调至 7.2，高压灭菌。也可使用购买的 pH7.2 的 PBS 缓冲液。

(10) 胰蛋白酶：0.25%胰蛋白酶，0.02% EDTA。

(11) 0.1%明胶。

8.2.1.3 ES 细胞的常规培养

(1) 用 0.1%明胶处理培养皿，按上述方法制备饲养层。

(2) 弃去原培养基，加入 PBS 洗 1 次。

(3) 加入 0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液，消化 3~5min 后，加入含 15%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中和胰蛋白酶。

(4) 用吸管轻轻吹打，直至成为单细胞悬液。

(5) 将细胞悬液按 1：3 的比例转移到新的含有饲养层的细胞培养皿，混匀后，置入

5% CO_2、37℃培养箱中培养。

(6) 每日换液一次，一般 3 天后可传代。换液前，需将培养基或所需溶液预热到 37°C 或室温。传代应在 ES 克隆外周出现分化的内胚层细胞之前进行。

8.2.2 电穿孔转染 ES 细胞

目前最常用的而且成功的方法是通过电穿孔技术转染 ES 细胞。采用电穿孔法转染 ES 细胞，在获得理想转染效率的条件下，将导致 50%的 ES 细胞死亡。影响转染效率和细胞存活力的因素包括电压、离子浓度、DNA 浓度及细胞密度。对不同的 ES 细胞系而言，获得理想的转染效率和细胞存活力必须综合考虑以上各种因素并进行预实验。以下是基于在原代胚胎成纤维细胞上培养的 TCl ES 细胞的电穿孔方法：

(1) 复苏的 ES 细胞传代后的第 2 天(36h)进行转染实验。

(2) 转染 2h 前，换新鲜的培养基。

(3) 吸弃培养基，用 PBS 漂洗培养皿 2 次。

(4) 每直径 90mm 培养皿加 1.5 ml 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液，37°C、放置 3~5min。

(5) 加 3.5ml ES 细胞培养基，用吸管反复抽吸，20 次。用血细胞计数板测定细胞总数，通常每个打靶载体每次转染约需 2×10^7 个细胞。

(6) 1000r/min 离心 ES 细胞悬液 5min。吸弃上清，将细胞重悬于 10ml PBS 中。

(7) 重新 1000r/min 离心 5min。将细胞重悬于 PBS 中，使细胞密度达到 2×10^7 个/ml。

(8) 将 30~50μg 线性化的打靶载体 DNA 与 1ml 细胞混匀，装入电穿孔槽中，室温放置 5min。

(9) 在基因脉冲仪中电击(600V，25μF)，室温放置 1min。

(10) 将电穿孔槽中的细胞与 7ml 新鲜的 ES 细胞培养基混匀，分入 4 个已长满滋养层细胞的直径 90mm 培养皿中。

(11) 将 40μl 未转染的细胞铺于一个直径 90mm 培养皿中作为对照。

(12) 24h 后，换成含 G418(280μg/ml)和 gancyclovir(2μmol/L)的 ES 细胞筛选培养基，此后每天更换新鲜的筛选培养基。通常转染 7 天后可以开始挑取克隆。

8.2.3 阳性 ES 克隆的挑取

(1) 转染后的 ES 细胞在药物筛选培养基中培养 7~8 天后，弃培养基，PBS 洗一次，再换上 10ml PBS。

(2) 将 200μl 自动移液器调整至 20μl，用枪头在显微镜下挑选抗性 ES 克隆。

(3) 转移每一个克隆到一个空的 96 孔培养板中。

(4) 每个 96 孔培养板的孔中加 50μl 0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液，37°C 作用 3~5min。

(5) 每孔加入 100μl ES 细胞培养基。将 100μl 八通道自动移液器调整至 80μl，用枪头反复吹吸，使 ES 克隆变成单细胞悬液。将每个 ES 克隆的单细胞悬液等分至两个预先接种好滋养层细胞的 96 孔培养板中。两个培养板中克隆的位置和次序完全相同。

(6) 每天换新鲜的 ES 细胞培养液，培养 2~3 天后，将其中一块 96 孔培养板冻存。

(7) 将剩余一块 96 孔培养板中的 ES 克隆经胰蛋白酶消化后转移至预先接种好滋养层细胞 24 孔培养板中培养，长满后提取基因组 DNA 用于鉴定。

8.2.4 阳性 ES 克隆的冻存

每次打靶实验通常要筛选 100~1000 个 ES 克隆。在 96 孔培养板中直接冻存 ES 细胞可以大大减少工作强度和实验费用。

(1) 吸弃培养基，加入 100μl PBS。

(2) 吸弃 PBS，加入 50μl 用 PBS 稀释的 0.125% 胰蛋白酶-EDTA 溶液，37°C 作用 3~5min。

(3) 加入 100μl 冻存培养基(15% DMSO，20% 胎牛血清，65% DMEM)。

(4) 用八通道自动移液器分散并混匀细胞。用封口膜封好 96 孔培养板，并将其封入塑料袋中，培养皿表面和塑料袋表面均做好标记。

(5) 为了减慢冷冻速度，将培养皿放入泡沫盒中，再置于−80°C 冰箱中冻存。

8.2.5 ES 克隆基因组 DNA 的制备

(1) 每孔加入细胞裂解缓冲液[0.5% SDS，0.1mol/L NaCl，0.01mol/L EDTA，0.02mol/L Tris · Cl(pH7.6)，蛋白酶 K，100μg/ml]400μl，室温 5min，再转移至 Eppendorf 管中。

(2) 50°C 保温 2h。

(3) 每管加入 200μl 饱和的 NaCl(6mol/L)。

(4) 将 Eppendorf 管置于纸盒中剧烈晃动 200 次。

(5) 将 Eppendorf 管置于冰上 10min。

(6) 室温 14 000 r/min 离心 10min。

(7) 将上清 500μl 转移至干净的 Eppendorf 管中，每管加入 0.8ml 乙醇，混匀。

(8) 14 000r/min 离心 5min，弃上清。

(9) 加入 1ml 70%乙醇洗涤沉淀，12 000r/min 室温离心 5min。

(10) 将 Eppendorf 管口朝下，室温干燥。将 DNA 重悬于 50~100μl TE 中，37°C 保温至 DNA 完全溶解后(24~48h)可用于 PCR 或 Southern 杂交分析。

8.2.6 PCR 法筛选中靶 ES 细胞

如果确定要用 PCR 方法筛选，设计打靶载体时一侧同源臂长度通常应小于 3kb。采用 0.6~1.2kb 长度的短臂最容易用 PCR 方法检测。如果同源臂序列过长，可尝试使用长距离 PCR(long-distance PCR)。要检测正确同源重组事件的发生，PCR 反应的引物，一条必须设计在 *neo* 基因上，另一条引物则应设计在跨过打靶载体短臂，即打靶载体外侧的内源基因片段上。

8.2.6.1 普通 PCR

按以下配方设置 PCR 反应：

100ng/μl DNA 样品	1μl
10×PCR 反应缓冲液	5μl
2.5mmol/L dNTP 混合物	4μl
10μmol/L 上游引物	1μl
10μmol/L 下游引物	1μl
5U/μl Taq DNA 聚合酶	0.5μl
去离子水	37.5μl

按以下条件进行 PCR 反应：50°C、10min，94°C、2 min。94°C、30s，引物 T_m −5°C、30s，72℃、1min/kb，共 30 个循环。72℃、10min。

反应结束后取 10μl PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

8.2.6.2 长距离 PCR

使用两种不同的 DNA 聚合酶混合物：一种是无校读活性的 DNA 聚合酶作为主要成分，另一种是低浓度的具有校读活性的 DNA 聚合酶，可有效地扩增长片段 DNA(Cheng et al. 1994)。以下是使用 Tth(ABI/Perkin-Elmer)和 Vent (New England Biolabs)扩增的方法，据称以哺乳动物复杂基因组为模板，可扩增长度达 10kb 的片段。

反应体系如下：

DNA 样品	20~100ng
5×PCR 反应缓冲液	10μl
2.5mmol/L dNTP 混合物	4μl
10μmol/L 上游引物	2μl
10μmol/L 下游引物	2μl
Tth DNA 聚合酶	2~5U
Vent(或 Pfu)DNA 聚合酶	0.1U
去离子水补足	50μl

5×PCR 反应缓冲液成分如下：

425mmol/L 乙酸钾
125mmol/L Tricine pH 8.7(调 pH 用 KOH)
40%甘油
5% DMSO
1.2mmol/L 乙酸镁

PCR 反应条件如下：

1 循环	变性	95℃	2min
15 循环	变性	95℃	10s
	退火	T_m −5℃(>58℃)	30s
	延伸	72℃	3min

15 循环	变性	95℃	10s
	退火	T_m −5℃(>58℃)	10s
	延伸	72℃	3min +20~40s/循环
1 循环	延伸	72℃	10~15min

8.2.7 Southern 杂交法筛选中靶 ES 细胞

用来自 ES 细胞基因组的 DNA 片段作为同源臂，采用正负两种筛选标记基因，通常可以达到 1/10~1/100 的中靶概率。如此高的中靶概率，使得用 Southern 杂交方法直接进行筛选分析变得十分有吸引力。为了有效区别同源重组事件和随机整合事件，用于 Southern 杂交的探针(flanking probe)应位于同源臂外侧。为使 Southern 杂交实验成功，务必先确定合适的限制性内切核酸酶和探针。

(1) 用一种或多种限制性内切核酸酶充分消化 10~15μg ES 细胞基因组 DNA。

(2) 在琼脂糖凝胶(0.8%)上缓慢电泳(电压<1V/cm)，直到能区分目的条带为止。

(3) 电泳后在紫外光下拍照，沿凝胶边缘放置一透明荧光直尺，以便能从照片中读出 DNA 标准参照物的迁移距离。

(4) 将凝胶置于数倍体积的 0.25mol/L HCl 中，温和振摇 15min。此步骤使 DNA 脱嘌呤产生缺口提高转移的质量，但如果目的片段长度小于 20kb，应避免进行，因为脱嘌呤反应很难控制，如果过量进行，将会产生多余的 DNA 片段并降低杂交信号。

(5) 将凝胶浸泡于数倍体积的变性缓冲液中(1.5mol/L NaCl，0.5mol/L NaOH)，温和振摇 45min。

(6) 弃去变性缓冲液，加入数倍体积的中和缓冲液(1mol/L Tris · Cl pH7.4，1.5mol/L NaCl)，于室温不断振摇 25min。

(7) 弃去中和缓冲液，再加入数倍体积的中和缓冲液，于室温不断振摇 20min。

(8) 将凝胶置于 20×SSPE 中，室温 30min。

(9) 用毛细管转移法将 DNA 中琼脂糖凝胶电泳转移到硝酸纤维素滤膜上。

(10) 转移结束后，用铅笔标记凝胶加样孔的位置。

(11) 6×SSPE，室温漂洗 5min。

(12) 将滤膜置于两组 3mm 滤纸中间，用真空炉于 80°C 干烤 45min。

(13) 将滤膜置于预杂交液中(10×Denhardt，4×SET，0.1% SDS，0.1% $Na_2H_2P_2O_7$，100μg/ml 变性的鲑精 DNA)，65°C 温育 1h。

(14) 将鲑精 DNA 于 100°C 加热 5min 使其变性，迅速置于冰上 5min。加入 100μl (10mg/ml)鲑精 DNA 于预杂交液中，65°C 继续温育至少 3h。

(15) 用随机引物法制备放射性 DNA 探针。探针标记结束后，100°C 加热 5min 使其变性，迅速置于冰上 5min。

(16) 将变性探针加入到预杂交液中，65°C 杂交过夜。

(17) 将滤膜转移至盛有数百毫升的漂洗缓冲液(0.4×SET，0.1% SDS，0.1% $Na_2H_2P_2O_7$)中，于 65°C 水浴摇床中温和摇动漂洗 3 次，每次 30min。20×SET 缓冲液：3mol/L NaCl，0.4mol/L Tris · Cl，pH7.5，20mmol/L EDTA。

(18) 将滤膜置于两张滤纸中稍事干燥，用保鲜膜包好滤膜，于暗室将滤膜置于 X 射线胶片夹中于−70°C 加增感屏曝光 12~48h 后显影。

8.2.8 中靶 ES 细胞的复苏和扩大培养

(1) 取出冻存的 96 孔板，在 37℃孵箱中使细胞悬液尽快融化。

(2) 将细胞悬液移入接种有饲养层的 24 孔板中，放入 5% CO_2、37℃培养箱中培养，次日换液。

(3) 待 ES 细胞长到合适密度后(通常 3 天)，消化细胞制成细胞悬液转移至 6 孔板中继续培养。

(4) 待 ES 细胞长到合适密度后(通常 3 天)，消化细胞制成细胞悬液转移至 3 个 6 孔板中继续培养。

(5) 待 ES 细胞长到合适密度后(通常 3 天)，冻存 2 孔细胞，余下一孔或者用于囊胚注射制备嵌合体小鼠，从整体水平研究靶基因的功能，或者扩大培养后进行新一轮打靶实验，以获得携带两条突变染色体的 ES 细胞，从细胞水平研究靶基因的功能。至于囊胚显微注射以及胚胎移植的具体操作，请读者参照本书相关章节或相关文献，这里不再赘述。

(袁红丰　杨　晓　裴雪涛)

主要参考文献

Cheng S, Fockler C, Barnes W et al. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. Proc Natl Acad Sci, 91(12): 5695~5699

Deng C, Capecchi MR. 1992. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. Mol Cell Biol, 12(8): 3365~3371

Hasty P, Rinera-Perez J, Chang C et al. 1991. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. Mol Cell Biol, 11(9): 4509~4517

Hasty P, Rivera-Perez J, Bradley A. 1992. The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. Mol Cell Biol, 12(6): 2464~2474

Suemori H, Nakatsuji N. 1987. Establishment of the embryo-derived stem cell lines from mouse blastocysts: effects of the feeder cell layer. Development Growth and Differ, 29(2): 133~139

Te Rigle H, Maandag ER, Berns A. 1992. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. Proc Natl Acad Sci USA, 89(11): 5128~5132

Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell, 51(3): 503~512

第9章　干细胞与组织工程实验技术

组织器官的病损或功能障碍是人类健康所面临的主要危害之一。修复或替代因疾病、创伤或遗传因素所造成的组织器官缺损或功能障碍一直是人类的梦想和难以攻克的医学高峰。自从《科学》评出1999年的十大进展，干细胞的研究名列第一后，在短短的一年中，科学家发现干细胞可以发育成各种组织的细胞，给用干细胞治疗各种人类疾病带来了希望。用干细胞培育新组织和新器官，这对于奋战多年的组织工程领域的科学家来说已不再是一个幻想。

组织工程是应用细胞生物学和工程学原理，将体外培养的功能相关的活细胞种植于天然或人工合成的具有良好生物相容性和可降解性的聚合物支架上，复合移植于体内组织器官缺损部位，完成修复和再造。其主要由种子细胞、生物材料、组织构建以及临床应用四个研究内容构成。近20年来，组织工程取得了迅猛的发展，已成为一个国家医学发展水平的重要标志之一，但是组织工程面临的困难和障碍还是很多，如细胞的来源、培养细胞的方法、诱导血管生长以及组织和器官的三维结构重建等。

在组织工程的研究与应用中，种子细胞的来源、功能、均一性、规模化扩增、分化能力和老化等是制约组织工程发展的重要瓶颈问题之一。随着干细胞研究的不断深入和突破，它给组织工程种子细胞的选择带来了新的希望。干细胞是人体及其各种组织细胞的最初来源，具有高度自我复制能力、高度增殖和多向分化潜能、可植入性和重建能力等特征。这些特点使得干细胞可以通过细胞分裂维持自身细胞群的大小，同时又可以进一步分化成为各种不同的组织细胞，从而构成机体各种复杂的组织器官。

以此为目的的组织工程几乎涉及人体所有的重要组织和器官，也涉及人类面临的大多数医学难题，如心血管疾病、糖尿病、骨质疏松、肌肉、骨及软骨缺损、老年性痴呆、脊髓损伤和遗传性缺陷等疾病的治疗。本章将干细胞在骨、软骨、心肌、血管和肝脏组织工程中的应用做一个简单的技术描述。

9.1　干细胞与骨组织工程

9.1.1　概述

由各种原因造成的骨缺损是骨科的常见病，是导致伤残的重要原因。骨缺损通常采用骨移植治疗，其中自体骨移植的临床效果较好。目前，随着组织工程技术的日益发展，骨组织工程越来越受到人们的关注(Langer et al. 1993)。

组织工程技术中所得到的骨组织，取材来源广阔，少有免疫排斥反应，材料成本低廉，可重复制作，供给量大和商品化，其社会效益和经济效益十分明显。

骨组织工程的三个要素(鄂征等 2003)：

(1) 可以发生增殖分化的成骨细胞，可以是来源于自体，也可以是外源性。

(2) 细胞依附的支架材料，能为细胞黏附生长、分化提供适宜环境。

(3) 有适当的生长因子，它可以由外部提供，或有转染细胞产生，也可以由细胞自分泌产生。

骨组织工程研究通常采用的方法是：将体外培养扩增的成骨系细胞在体外种植于适宜的支架材料再植入体内骨缺损处，或是将诱导成骨因子与支架材料复合后植入体内，通过诱导成骨因子发挥作用，促进新骨生成。

9.1.2 骨组织工程的种子细胞中的干细胞的分离培养

9.1.2.1 骨髓来源的间充质干细胞

同 4.2 中的步骤。

9.1.2.2 脂肪来源的间充质干细胞(以大鼠为例)(Zuk et al. 2001)

1) 器械

烧杯、组织剪、镊子、眼科剪、眼科镊、培养皿、50ml 离心管、10ml 离心管、80 目筛网、200 目筛网、摇床、离心机、孵箱、25ml 的培养瓶、吸管、倒置显微镜。

2) 试剂

PBS(phosphate buffer solution)、D-Hank 缓冲液、0.2%的 I 型胶原酶、2%的 BSA(bovine serum albumin)、75%乙醇、红细胞裂解液、L-DMEM(含 10%胎牛血清、1%双抗)。

3) 步骤

(1) 脱臼法处死雄性大鼠，75%乙醇浸泡 5min，无菌条件下剖开腹部，找到睾丸，在附睾部位有一小块脂肪组织，用眼科剪将脂肪组织剪下，注意尽量不要带有血管。

(2) 用 PBS 或者 D-Hank 缓冲液浸洗 2 遍，尽量洗去血液。

(3) 在平皿中加入一吸管的 D-Hank 缓冲液，用眼科剪将脂肪组织剪成大小约 $1mm^3$ 的组织块。

(4) 将剪碎的组织块连同液体一同加入 50ml 的离心管，加入同体积的浓度为 0.2% 的 I 型胶原酶并加入一半体积浓度为 2%的 BSA，用封口膜将管口封好，放入 37℃的摇床中，摇床的速度为 120r/min，消化 40min。

(5) 取出离心管，用 75%乙醇彻底消毒，将离心管中的液体依次通过 80 目和 200 目的滤网。

(6) 将过滤后所得的液体加入红细胞裂解液，静置 10min，然后以 1200*g* 的速度离心 5min。后弃上清液，用 D-Hank 缓冲液或者 PBS 重悬，然后以 1200*g* 的速度离心 5min 后弃上清液，重复一次。

(7) 将所得的细胞用含有 10%胎牛血清及 1%双抗的 L-DMEM 培养基吹打使细胞分散成单细胞悬液。然后接种入两个 25ml 的培养瓶，并放入 37℃、5% CO_2，饱和湿度的孵箱中培养。注意在 48h 内不要晃动培养瓶，使细胞充分贴壁。

(8) 48h 后更换培养基，以后每 3 天更换一次培养基，等到细胞铺满培养瓶底 80% 的时候，开始传代。

9.1.3 支架材料的选择

理想的骨组织工程的支架材料应满足以下要求(鄂征等 2003):

(1) 良好的生物相容性：除满足生物材料的一般要求，如无毒、无致畸作用外，其降解产物应对细胞无毒害作用，不引起炎症反应。

(2) 良好的生物降解性：材料的降解率应与新生组织的生长率相适应，降解时间应能根据新生组织的生长特性做人为调控。

(3) 具有三维内联多孔结构：孔隙率最好达到 60%以上，具有较高的面积体积比，利于血管和神经的长入，有利于细胞的黏附生长，细胞外基质沉积，营养和氧气进入和代谢产物的排出。

(4) 易加工、易塑形、临床使用方便。

(5) 有一定的机械强度和韧性，满足临床应用的需要。

(6) 材料的表面有利于细胞的黏附生长，利于细胞的分化。

目前研究中应用较多的有生物活性陶瓷，人工可降解聚合物和天然材料三大类，而多种成分的复合型材料今年越来越成为研究的热点。

(1) 生物陶瓷，如羟基磷灰石(HA)和磷酸三钙(TCP)等。

(2) 人工合成的可降解聚合物，如聚乳酸(PLA)和聚羟基乙酸(PGA)以及其两者的共聚物 PLGA，聚丁酸(PHB)及其与聚羟基戊酸(PHV)的共聚物 PHBV，聚酯脲烷(polyesterurethane)，聚酸酐等。

(3) 天然材料，如胶原、甲壳素及其衍生物、藻酸盐、纤维蛋白、天然珊瑚等。

(4) 复合材料，如钙磷陶瓷/胶原复合材料(collagen-hydroxylapatite，CHA)、胶原/高分子聚合物复合材料、钙磷陶瓷/高分子聚合物复合材料等。

9.1.4 细胞与支架材料的复合

细胞与支架材料的复合方法根据材料的不同而不同(Kim et al. 2005)。下面以 PLGA 及骨髓间充质干细胞为例来介绍细胞与支架材料的复合方法。

1) 器械

镊子、眼科剪、眼科镊、培养皿、孵箱、计数板、吸管、倒置显微镜。

2) 试剂及材料

PBS、L-DMEM(含 10%胎牛血清及 1%双抗)、0.02% EDTA、0.25%的胰酶、PLGA、0.25%戊二醛、无水乙醇、胎牛血清。

3) 步骤

(1) 将支架材料切割成合适大小。

(2) 钴源照射消毒。

(3) 将支架材料放入含双抗的 L-DMEM 中浸泡 3 天后，吸去培养基，PBS 冲洗 3 遍。

(4) 将骨髓间充质干细胞用含 0.02% EDTA、0.25%的胰酶消化，计数。

(5) 将细胞悬液调整浓度为 1.0×10^5 个/ml。

(6) 取适量的单细胞悬液滴于 PLGA 支架材料上，37℃、5% CO_2条件下培 6h 后补加 L-DMEM 2ml，并加入胎牛血清，使其最终浓度为 15%。

(7) 常规 3 天换液一次。

(8) 1 周后吸去培养基，PBS 洗涤 3 遍，0.25%戊二醛固定，无水乙醇脱水，自然风干喷金，扫描电镜观察。

9.1.5 诱导分化

9.1.5.1 骨髓间充质干细胞

1) 诱导培养基的成分

含有 10%胎牛血清,1%双抗的 L-DMEM 另外加入 0.1μmol/L 地塞米松,50μmol/L *L*-抗血酸-2-磷酸酯，10mmol/L *β*-磷酸甘油。

2) 器械

10ml 离心管、离心机、孵箱、25ml 的培养瓶、吸管、计数板、倒置显微镜、96 孔培养板、200μl 的枪及枪头。

3) 试剂

PBS、L-DMEM、胎牛血清、双抗、0.02% EDTA、0.25%的胰酶。

4) 步骤

(1) 骨髓间充质干细胞常规胰酶消化，计数。

(2) 用普通的含有 10%胎牛血清，1%双抗的 L-DMEM 培养基调整细胞浓度为 10^5个 /ml。

(3) 按每孔 100μl 的量接种入 96 孔板。

(4) 24h 后更换为诱导培养基。

(5) 每 3 天更换培养液一次，3 周后进行成骨细胞的检测。

9.1.5.2 脂肪来源的间充质干细胞

目前脂肪来源的间充质干细胞向成骨细胞的诱导分化大多参照骨髓来源的间充质干细胞进行(Zuk et al. 2001)。

9.1.6 观察及检测

骨髓间充质干细胞及脂肪来源的间充质干细胞在诱导培养基的诱导下，在培养一周左右，可观察到少许细胞由梭形变成多角形。随着时间的增长，多角形的细胞逐渐增多并聚集成团形成细胞结节。

成骨细胞的主要功能是合成分泌骨基质，并促进基质矿化形成骨组织(鄂征等 2003)。目前，对成骨细胞来说，比较特异性的指标有：I 型胶原、碱性磷酸酶、矿化结节。

9.1.6.1 I 型胶原的检测

1) 组织化学的方法

将细胞培养在盖玻片上，同 Masson 染色的方法，观察胶原的分布。胶原染为蓝色，细胞质染成蓝褐色。

2) 免疫组化的方法(杨志明 2004)

(1) 细胞爬片或冰冻切片 PBS 洗 2 次，每次 3min。

(2) 4%多聚甲醛室温固定 30min。

(3) PBS 室温洗涤 2 次，每次 3min。

(4) 用含 0.1% Triton X-100、0.3%双氧水-甲醇的溶液室温封闭 30min。

(5) 蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5min。

(6) 10%山羊血清的 PBS 缓冲液(pH7.2)室温孵育 1h。

(7) 4%的胃蛋白酶浸泡 1h。

(8) 分别加入一抗为 I 型胶原单克隆抗体工作液 50μl。

(9) PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 5min。

(10) 滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液，37℃孵育 15min。

(11) PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 5min。

(12) 滴加含 0.05% DAB、0.03% 双氧水的 0.01mol/L Tris · HCl 缓冲液显色 10min。

(13) 流水冲洗 5min。

(14) 阴性对照试验用 0.01mol/L PBS 代替一抗进行免疫组化染色。

(15) 显微镜下观察试验结果。

成骨诱导 21 天，免疫组化 SP 法可检测到 I 型胶原的表达，在结节周围呈黄褐色。

9.1.6.2 碱性磷酸酶

9.1.6.2.1 钙钴法

甲醛-钙固定液：4% 甲醛液 5ml 加入 1g $CaCl_2$ 溶于 45ml 水中。孵育底液：2% β-甘油磷酸钠 10ml、2%巴比妥钠 10ml、2% $CaCl_2$ 10ml、2%的硫酸镁 1ml 加入 5ml 蒸馏水中。

步骤

(1) 细胞爬片固定：4℃甲醛钙液固定 2h。

(2) PBS 洗 2 遍，每次 5min。

(3) 加入孵育底液 37℃孵育 1.5h 后蒸馏水室温冲洗 1~2min。

(4) 2%硝酸钴内浸泡 2min。

(5) 蒸馏水常温冲洗 2min。

(6) 1%硫化铵洗 1min，自来水冲洗，自然干燥，封固。

(7) 观察结果。

碱性磷酸酶阳性的细胞呈褐色至黑色。诱导的第 7 天可见到碱性磷酸酶呈弱阳性反应，第 14 天呈强阳性反应。

9.1.6.2.2 偶氮耦联法

孵育底液的配制：萘酚 AS-BI 磷酸盐 20mg、DMSO 0.5ml、六偶氮副品红 0.5ml 溶

入 50ml 0.2%mol/L 巴比妥乙酸冲液(pH9.2)50ml。

步骤

(1) 细胞爬片 10%甲醛溶液中固定 10min(4℃)。

(2) 蒸馏水冲洗。

(3) 将过滤后的孵育底液滴加于细胞爬片上。室温下作用 45min。

(4) 流水冲洗，晾干。

(5) 甘油明胶封固。

胞质中可见红色的碱性磷酸酶阳性颗粒。

9.1.6.3 矿化结节染色

9.1.6.3.1 茜红素法

步骤

(1) 培养皿中 PBS 冲洗 2 遍，95%乙醇固定 10min。

(2) 蒸馏水洗 3 次。

(3) 0.1%茜红素-Tris · HCl(pH8.3)，37℃、30min。

(4) 蒸馏水冲洗，干燥后封固。

染料的品种不同，矿化结节成不同的红色。

9.1.6.3.2 von Kossa 染色

步骤

(1) PBS 洗细胞爬片 3 次，每次 2min。

(2) 中性福尔马林液室温固定 5min。

(3) 室温下蒸馏水洗涤 2 次。

(4) 5%硝酸银浸泡 2h。

(5) 紫外光照 1h。

(6) 室温下蒸馏水冲洗 2min。

(7) 5%硫代硫酸钠中和残留的饿硝酸银。

(8) 干燥封片。

(9) 显微镜下观察结果。

(李绍青　管利东)

9.2 干细胞与软骨组织工程

关节软骨缺损是常见的疑难病症之一。软骨缺损后难以自体修复，因为软骨细胞几乎没有迁徙能力，增生能力差，再生能力低。目前临床上多通过自体或异体移植成形的软骨或具有成软骨潜能的组织如骨膜、软骨膜等来治疗关节软骨的缺损，这些组织移植后能生成透明软骨样组织，但其生物学性能、耐磨性、韧性均欠佳，易蜕变。随着材料学、生命科学以及相关物理、化学学科的发展，人们提出了一种新的方法——组织工程，它为关节软骨缺损的修复提供了新的思路与途径。软骨组织工程的基本技术路线是在体

外培养种子细胞，并以较高浓度将其种植于具有良好的生物相容性和降解性的合适支架上，从而形成细胞-支架复合物，将此复合物植入生物体内组织缺损部位，最终完成组织的修复和再造。以下以干细胞来源的软骨细胞作为种子细胞为例对软骨组织工程的系统模式做一个简单的介绍。

9.2.1 软骨组织工程的种子细胞

获得一定数量能满足治疗需要的种子细胞是软骨组织工程的关键。目前种子细胞主要有以下 3 种来源：

(1) 自体或同种异体软骨细胞；

(2) 通过基因工程技术改良的永生化软骨细胞；

(3) 干细胞来源的软骨细胞。

自体软骨细胞作为组织工程种子细胞是最理想的细胞来源。但自体软骨组织取材小难以达到应有的细胞数量，体外培养扩增细胞易发生“去分化”而失去原有的特征。异体软骨细胞曾广泛应用，但因引起免疫排斥反应，导致细胞死亡、功能丧失及可能传播疾病而放弃。现在人们把目光又转向了干细胞来源的种子细胞。下面介绍胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞和骨膜来源的软骨细胞的分离获取和培养。

9.2.1.1 胚胎来源的软骨细胞

1) *鸡胚来源的原代软骨细胞*(Kulyk et al. 1996)

(1) 分离 18/19~24/25 发育阶段的鸡胚翅芽末端的翅尖部分。

(2) 剥离外胚层，余下组织切成 $1mm^3$ 组织块，种于纤连蛋白包被的 35mm 的培养皿中(用含有 20μg 人纤连蛋白的 1ml 溶液铺满瓶底，37℃过夜)。

(3) 10~20min 黏附后，加入含有 1% FBS 和 CR-ITS 混合液(5μg/ml 人转铁蛋白、5μg/ml 亚硒酸钠、5μg/ml 胰岛素)F12 培养基。

(4) 37℃、5% CO_2、95%湿度环境培养。

2) *胚胎来源成软骨细胞系* ATDC5(Shukunami et al. 1996)

(1) ATDC5 来自于小鼠胚胎瘤。

(2) 1∶1 的 DMEM 和 F12 培养基(补充 5% FBS、10μg/ml 人转铁蛋白、3×10^8mol/L 亚硒酸钠)，37℃、5% CO_2、95%湿度环境培养。

(3) 向软骨诱导时加入 10μg/ml 牛胰岛素，持续培养 21 天。接种密度如下：2×10^4 个/孔于 24 孔板，4×10^4 个/孔于 12 孔板，6×10^4 个/孔于 6 孔板。

9.2.1.2 骨髓间充质来源的软骨细胞

1) *细胞分离培养*

见前面章节。

2) *成软骨分化*(Johnstone 1998)

诱导培养基为高糖 DMEM，补充有 ITS(6.25μg/ml 胰岛素、6.25μg/ml 转铁蛋白、6.25μg/ml 亚硒酸)，5.35μg/ml 亚油酸，1.25μg/ml BSA，1mmol/L 丙酮酸盐，37.5~50μg/ml

抗坏血酸，10^{-7}mol/L 地塞米松，0.5~10ng/ml TGF-β_1 或者 TGF-β_3。

9.2.1.3 骨膜来源的软骨细胞

1) 细胞分离培养

(1) 去除牛掌骨上的皮肤和皮下肌肉纤维结缔组织，暴露骨膜。

(2) 取出骨膜，放入 PBS 中，加入 100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素。

(3) 冲洗骨膜，用眼科剪剪成 1mm^3 大小的碎块，成骨面向下放入培养瓶中。

(4) 用含有 75mg/L 谷氨酰胺、10% FCS 的 DMEM 培养基连续培养 4 周，每 3 天换一次液。

2) 成软骨分化(Bahrami et al. 2000)

(1) 胰酶-EDTA(0.25%胰酶，1mmol/L EDTA)消化 5~10min，洗涤，记数。

(2) 1%高熔点琼脂糖高压灭菌 15min，温度降到 90℃时迅速铺瓶，22℃以下凝固。

(3) 2%低熔点琼脂糖高压灭菌 15min，温度降到 37℃时和等量的接种密度为 5×10^5 个/cm^2 细胞的 DMEM 混合，移入预先铺有琼脂糖凝胶的培养瓶里，37℃、7.5% CO_2 环境培养。

(4) 凝胶培养基混合液使用量：35mm 培养瓶加入 0.5ml，60mm 培养瓶加入 1ml，100mm 培养瓶加入 2.5ml。

(5) 成软骨分化时使用高糖 DMEM(含有 4.8g/L 葡萄糖)，补充有 10% FCS、50μg/ml 抗坏血酸、1mmol/L 半胱氨酸、1mmol/L 丙酮酸盐、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素。

(6) 培养 2 周后分析。

9.2.1.4 软骨细胞的培养、特征鉴定

1) 二维扩增培养(Benya et al. 1982)

(1) 软骨细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37℃、10% CO_2 湿度环境培养，每 2~3 天换新鲜培养液。

(2) 当细胞生长到达 80%~90%融合时，胰酶-EDTA(0.25%胰酶、1mmol/L EDTA)消化传代。传代时用含 10% FBS 的 DMEM 以 1∶10 进行稀释，然后接种到培养瓶中。

2) 藻酸悬浮培养(Bonaventure et al. 1994)

(1) 胰酶-EDTA(0.25%胰酶、1mmol/L EDTA)消化的细胞以 10^6 个/ml 浓度重悬于 1.2%藻酸溶液中。

(2) 用 22 号针头的 10ml 注射器将藻酸溶液中的细胞逐滴滴入 0.1mol/L 的氯化钙溶液中，室温 10min。藻酸与氯化钙接触时会发生聚合作用，将悬液中细胞包裹，形成藻酸颗粒。

(3) 弃去氯化钙溶液，用 0.15mol/L 氯化钠洗涤 2 次，用含 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬藻酸颗粒(7~15 粒/ml)，37℃培养，每 2~3 天换液一次。

(4) 5ml 藻酸颗粒约含有 5×10^6 个细胞。在第 4 天至 5 个月之间可以收集细胞。收集时先吸去培养基，用 0.15mol/L 氯化钠洗涤 2 次，再加入 3 倍体积的藻酸解聚缓冲液(0.15mol/L 氯化钠，25mmol/L HEPES，55mmol/L 枸橼酸钠、pH7.0)，37℃温育 10min，吸除液体，获取细胞。

3) 琼脂糖凝胶培养(Buschmann et al. 1992, 鄂征等 2003)

(1) 将 1g 高熔点琼脂糖和 50ml 去离子水混合高压灭菌 15min。

(2) 温度降到 90℃时迅速铺瓶，形成一薄层。3.5cm 培养瓶用 0.5ml，6cm 培养瓶用 1.5ml，10cm 培养瓶用 2.5ml。22℃以下凝固 1h。

(3) 将 1g 低熔点琼脂糖和 25ml 去离子水混合高压灭菌 15min。

(4) 温度降到 37℃时用温的(37℃)移液管将等量细胞培养液和琼脂糖凝胶混合(1×10^6~4×10^6 个/ml 凝胶)。

(5) 用温的(37℃)移液管将细胞琼脂糖凝胶液移入预先铺有琼脂糖凝胶的培养瓶里。

(6) 凝胶后加入适量的培养基于 37℃、7.5% CO_2 环境培养，每 2~3 天换一次液。

(7) 凝胶培养基混合液使用量：35mm 培养瓶加入 0.5ml，60mm 培养瓶加入 1ml，100mm 培养瓶加入 2.5ml。

4) 胶原凝胶培养(Yasui et al. 1982)

(1) 用 0.001mol/L 乙酸配制 0.3%的 I 型胶原溶液，紫外灭菌。

(2) 在冰上(0℃)将 9 份胶原溶液逐滴加入到 10 份 2×的基本培养基中，同时轻轻地摇动。

(3) 将 1 份软骨细胞悬液(6×10^6 个/ml)加入胶原培养基混合液中。

(4) 将细胞胶原培养基混合液接种到多孔培养板中，37℃孵育，凝固。

(5) 添加完全培养基。37℃、7.5% CO_2 环境培养，每 2~3 天换一次液。

(6) 释放细胞时可用 0.3%胶原酶溶液浸透，37℃孵育 45min 即可。

5) 特征鉴定

原代培养的细胞呈圆形或椭圆形，可分泌少量细胞外基质。传代后，细胞变为多角形，很像上皮样细胞，细胞外基质增多。杨志明领导的研究小组观察显示在体外二维培养的情况下，前 3 代细胞生长旺盛，分裂细胞较常见。从第 4 代开始，多角形细胞逐渐变为梭形，向成纤维细胞样细胞转变。到第 6 代以后，培养物中以梭形细胞为主，细胞活力下降，同时细胞功能发生改变，出现去分化现象。而体外三维培养却可以使软骨细胞的表型和功能保持长期的稳定。

软骨细胞能够特异性地合成葡萄糖胺聚糖(GAG)以及 II 型和 X 型胶原，可以组织化学甲苯胺蓝染色法和胶原的抗体作免疫细胞化学染色来鉴定。具体方法见前面章节。

9.2.2 软骨组织工程支架材料的选择

用于软骨组织工程的支架材料种类很多，按来源分三大类：①天然生物材料，如胶原、明胶、纤维蛋白凝胶、甲壳素及其衍生物等；②人工合成材料，如聚羟基乙酸(PGA)、聚乳酸(PLA)、聚乳酸/聚羟基乙酸共聚物(PLGA)、透明质酸(HA)等；③复合型材料，如 PLA/HA 复合物、胶原/HA 复合物。

天然生物材料很多本身就为细胞外基质成分，因此具有良好的组织相容性和细胞相容性，可提供细胞生长三维结构，并且还保存着部分生长因子，对细胞的生长、分化起调控作用，在软骨组织工程中的应用具有非凡意义。但是天然生物材料的来源有限，难以大规模加工生产，并且抗原性消除不肯定，降解速度无法控制，力学性质差，塑形困

难等。与天然生物材料相比，人工合成材料可以精确的控制其相对分子质量、降解时间、疏水性和其他属性。如 PGA 和 PLA，它们是人工合成的可降解聚合物材料，具有良好的生物相容性，已被 FDA 批准为作为可吸收缝线和骨折内固定材料等。PLA 相对分子质量大，亲水性差，降解慢，与软骨生长不相匹配，PGA 亲水性好，但降解速度快，单纯 PGA 支架只能维持其结构完整性 3 周左右。因此，人们把二者优点相结合，制成 PGA 和 PLA 共聚体(PLGA)，可根据实际需要，调整 PLA 与 PGA 比例，完全人为调控降解速率和材料机械性能。现有研究表明，PLGA 是目前较理想的软骨组织工程材料，已成为研究最为广泛的支架材料之一。

软骨组织工程的三维支架充当着细胞外基质的作用，为接种的细胞提供黏附的场所，同时也提供细胞分泌的各种大分子的临时附着。支架材料不仅影响细胞生物活性和培养效率，而且决定着细胞支架复合物移植后能否与机体行好地适应和结合。

现有的研究表明，相互交通的多孔三维结构比较适合软骨细胞的附着、增殖、分化和代谢。多孔三维结构有利于细胞在三维空间中的运动和迁移，避免了二维培养中细胞接触抑制现象，使细胞能够保持旺盛的增殖态势。其中孔隙率和孔径是多孔三维支架结构的两个重要参数。目前软骨组织工程研究中使用支架的孔隙率并不统一，在 86%~97% 范围变动。支架孔径也是如此，有研究者认为以 50~100μm 为宜，但实际中有很多体内、体外培养出工程化软骨的支架孔径却在 100~300μm。杨志明领导的研究小组采用三种不同孔径的三种材料接种细胞后发现，细胞在小孔径(25~100μm)支架内的黏附要明显多于大孔径(100~500μm)支架(杨志明 2004)。

三维支架材料的表面理化性质也是一个很重要的参数。良好的表面理化性质有利于细胞的贴壁生长。一般而言，天然支架材料对细胞的吸附性要优于合成的生物聚合支架材料。

理想的软骨组织工程基质材料具有如下特征：

(1) 良好的生物相容性，包括与植入环境的相适应性，无毒性，有利于培养细胞的黏附、生长、增殖和分化。

(2) 良好的可降解性，基质材料在完成支架作用后能降解，降解速率与细胞生长速度相适应，具有可控性。

(3) 具有三维多孔结构，为细胞生长提供足够的空间和交换面积。

(4) 具有一定的弹性和机械强度。

(5) 具有承载生长因子的能力。

从材料学研究方面讲，各种应用材料都存在不同程度的缺陷，如生物相容性、机械强度和稳定性等，尚未有一种材料达到理想材料的要求。目前学者们大多致力于通过交联、修饰以及复合等手段改进材料的生物学和力学性能。现在虽然没有一种支架材料系统可以很完美的满足软骨组织工程的条件需要，但我们在进行支架材料设计时，一定要根据实际情况尽量满足细胞机体生长的特殊需要，以求产生最佳的效果。

9.2.3 种子细胞和支架材料的三维动态培养

通常情况下，将细胞置于培养瓶、孔板或者不具有三维结构的膜性材料上培养是二

维培养，细胞只能形成薄层培养物，不能够构建成三维结构的组织。软骨细胞在这种培养方式中短期可以维持一定的表型稳定，长期传代培养时就会出现反分化现象。近来研究表明，三维立体的培养有利于软骨细胞的增殖、分化和表型的保持稳定，甚至能使在二维培养中反分化的软骨细胞重新返回原代细胞的高分化状态。这是因为三维立体的环境更接近细胞在体内的情况，三维立体的空间为维系细胞的代谢活动提供了适宜的微环境，更有利于细胞之间，细胞和环境之间的信号传递，从而可以充分发挥对细胞增殖、分化和代谢的调节作用。现在软骨细胞的三维培养已经成为体外研究的主流。

9.2.3.1 材料的准备

根据构建组织部位的不同来考虑材料的选择准备，如材料的几何形状、大小、孔隙率、孔径、生物力学强度等。在细胞接种前，一般都做灭菌和预湿处理。不同的材料有不同的灭菌方法，预湿处理可以用 PBS 也可以用生长培养基。

以 PGA 为例：制备具有 96%~97%孔隙率，形成直径 12μm 的非编织网纤维，填充密度为 44~62mg/cm^3，做成直径为 5~10mm、厚 2~5mm 圆盘状支架，环氧乙烷灭菌处理，使用前生长培养基浸泡 24h。

9.2.3.2 细胞的种植

9.2.3.2.1 静态细胞种植

1) 沉淀法

这是最为常用的方法。种植浓度可达 7×10^4~15×10^4 个/mm^3 基质材料。将已预湿的支架材料置于培养皿中，制备高密度的细胞悬液。用移液管将 25~50μm 的细胞悬液缓慢逐滴滴入材料上，10min 后将材料轻轻翻转，再将另一半 25~50μm 的细胞悬液加入。此外，也可以用细微的注射针头将细胞注入材料中。上述种植法的缺点是细胞在材料上的分布可能不均匀(Freed et al. 1993)。

2) 真空吸附法

将已预湿的支架材料置于培养皿中，制备高密度的细胞悬液。用移液管将细胞悬液滴加于材料上，将整个培养皿置于负压容器中，反复抽吸空气造成真空负压，迫使细胞进入吸附于材料的内外部。2h 细胞黏附后小心加入基本培养基，24h 后再加入完全培养基。

这种静态种植方法的种植效率往往不超过 50%~70%，细胞在支架上的分布也不是很均匀的，通常支架的外围有更高的细胞密度(Ponticiello et al. 2000)。

9.2.3.2.2 动态细胞种植

将支架材料浸没在高密度细胞悬液中，采用旋转系统，使细胞更多更均匀地黏附于支架材料上。

很多动态种植技术都用静止型旋转瓶作为旋转系统，旋转瓶塞下穿插有一根或几根细长针，支架材料穿挂在细长针上，通过底部的磁力搅拌器搅动瓶底的小铁转子带动液体的旋转流动，经过几个小时旋转流动，细胞将会很均匀地黏附于材料上(Vunjak et al. 1999)(图 9.1~图 9.3)。

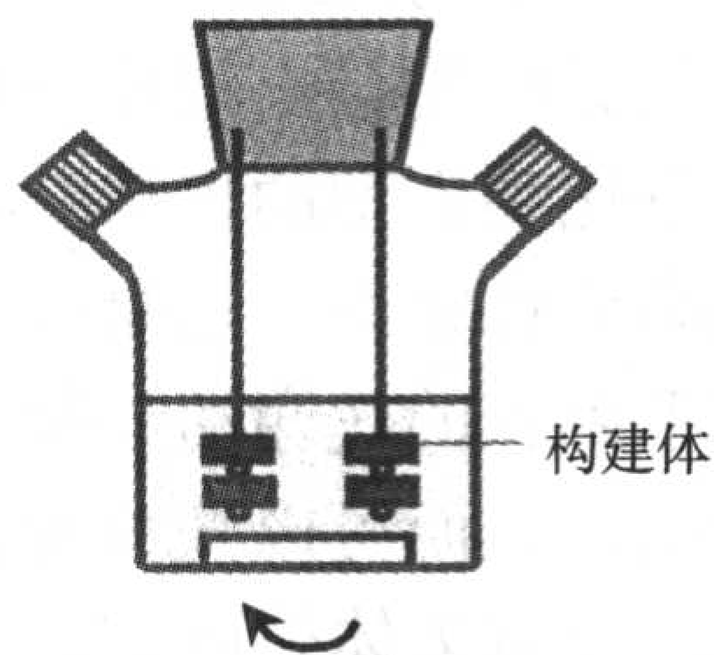


图 9.1　静止型旋转瓶

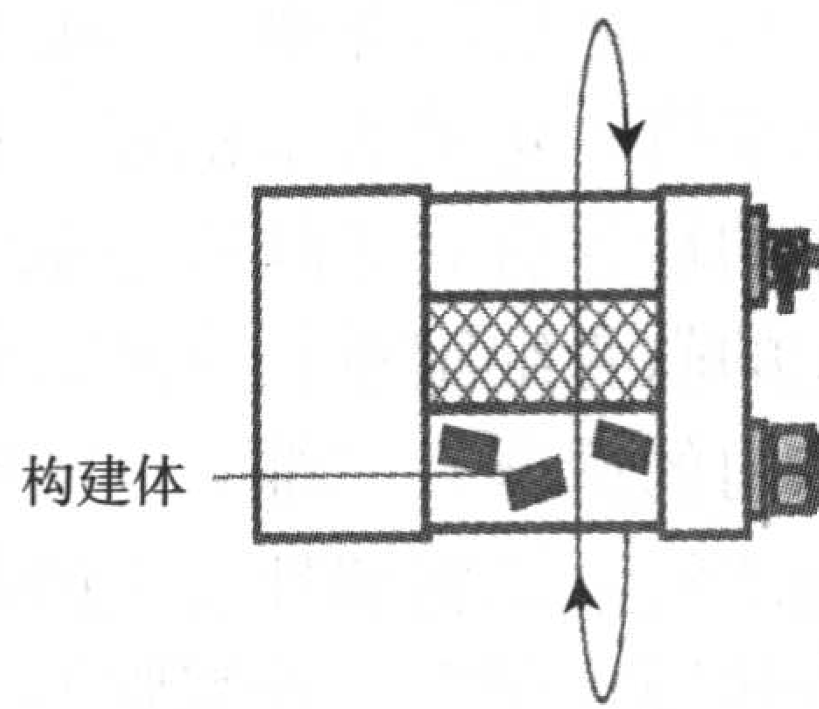


图 9.2　转动型反应器

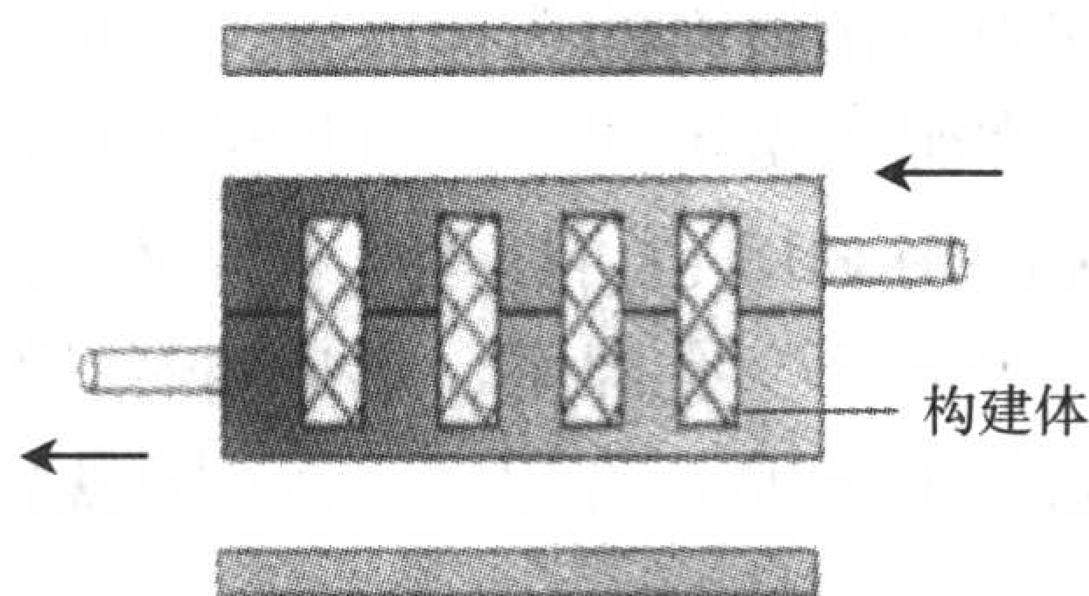


图 9.3　灌流型培养器

9.2.3.3　细胞材料三维培养

进行细胞材料的三维培养，必须应用特殊的培养容器。目前常见有三种培养器：

1) 静止型旋转瓶

这种旋转瓶主体是静止不动的，在旋转瓶底部里放置有磁力棒，整个装置放在磁力搅拌器上，通过电磁搅拌就可以带动旋转瓶中液体的旋转流动。在旋转瓶塞口下插有一根或多根细长针，支架材料就固定于这些细长针上，旋转瓶的两侧伸出两个角作为换液或通气口。

2) 转动型反应器

旋转瓶主体固定于一个底座上，随着底座一起转动，容器的中部放置细胞和材料。如美国宇航局生命中心研制的旋转培养系统(RCCS)。该系统的圆柱状培养容器中放置细胞或组织材料培养液充满整个容器。整个容器由电机驱动沿着水平轴旋转。培养液、细胞和支架材料随着容器一起旋转而不与容器壁和其他部件相触，细胞始终维持在自由落体的培养状态。

3) 灌流型培养器

灌流培养器的种类较多，设计比较复杂。培养液以一定速度流入反应器，同时又以相同速度从反应器中流出，而其中培养的细胞和材料载体则被截留在反应器内而不随培养液一起流出。它的特点是不断地加入新鲜培养基以及不断地抽走含细胞代谢废物的消耗培养基，使细胞得以在一个相对稳定的生长环境内生长增殖。近年来已经有研究人员用该系统培养软骨细胞与支架材料的复合体。结果显示软骨细胞与支架培养复合体在灌注培养系统内培养 50 天，再造软骨的组织学和力学特征均与天然软骨相似。

下面以静止型旋转瓶和旋转反应器细胞培养系统为例，描述软骨组织的三维培养。

(1) PGA 材料制成一定大小形状，环氧乙烷灭菌处理，用培养基预湿处理，固定于静止型旋转瓶或旋转反应器中。

(2) 培养瓶中加入 $120cm^3$ 的培养基，于 37℃、5% CO_2 培养箱预置 8~12h。

(3) 软骨细胞接种密度为 4×10^5~5×10^5 个/cm^3 培养基，静止型旋转瓶电磁搅拌速度为 50~80r/min，旋转反应器旋转速度为 15r/min。24h 内几乎所有细胞都发生附着。

(4) 培养 3 天后，静止型旋转瓶中的细胞材料复合体仍以 50~80r/min 搅拌速度培养，每隔一天半量更换培养基，连续培养 8 周。旋转反应器培养则速度从 15r/min 到 28r/min 逐渐增加，每隔一天全量更换培养基，连续培养 4 周。

9.2.4 三维培养组织评测

9.2.4.1 扫描电镜观察

取出培养器中细胞材料复合物，PBS 清洗，2%~3% 戊二醛 4℃固定 1~2h，PBS 清洗 2 次，1% 四氧化锇 4℃固定 1h，PBS 清洗 2 次，乙醇梯度脱水，临界点干燥，离子溅射仪喷金，扫描电镜处理观察细胞材料复合物。

9.2.4.2 组织学形态观察

苏木素-伊红(HE)和番红精-孔雀绿(Safranin O-Fast green)染色是观察软骨组织常用的染色方法(杨志明 2002；司徒镇强等 2004)。

9.2.4.2.1 苏木素-伊红(HE)染色

1) 试剂配制

(1) 苏木素：用滤网过滤后放入染缸。

(2) 伊红：0.5g 溶于 100ml 去离子水中。

(3) 盐酸乙醇溶液：用 75% 乙醇配成 1%盐酸。

(4) 稀氨水：200ml 去离子水中加入 2~3 滴浓氨水。

2) 染色步骤

(1) 石蜡切片浸入二甲苯脱蜡，20min/次×2。

(2) 经 100%、95%乙醇各 2 次，90%、80%、70%乙醇 1 次，逐级水化，每次 3~5min。

(3) 苏木素染液染色 5~10min，自来水浸洗。

(4) 盐酸乙醇溶液分色数秒，自来水浸洗。

(5) 氨水浸洗数分钟，组织胞核蓝化后，自来水浸洗。

(6) 伊红浸染 5~10min，自来水冲洗 5~15min。

(7) 经 70%、80%、90%乙醇各一次，95%乙醇 2 次，100%乙醇 3 次逐级脱水，每次 1min。

(8) 二甲苯透明 3 次，每次 1min。

(9) 中性树脂封片，镜检。

9.2.4.2.2 番红精-孔雀绿(Safranin O- Fast green)染色

1) 试剂配制

(1) Safranin O 染液：100ml 去离子水中加入 0.2g Safranin O，1ml 无水乙酸。

(2) Fast green 染液：100ml 去离子水中加入 0.2g Fast green，1ml 无水乙酸，配成储存液。染色时取上述储存液按 1：5 用去离子水稀释。

2) 染色步骤

(1) 石蜡切片干燥、脱蜡、水化同 HE 染色步骤。

(2) Safranin O 染色：浸入 Safranin O 染液 10min，去离子水漂洗 2min。

(3) Fast green 染色：浸入 Fast green 染液 10~15s，去离子水漂洗 1~2min。

(4) 脱水、透明和封片同上。

9.2.4.3 细胞增殖测定

取出培养器中的细胞材料复合物，0.25% 胰蛋白酶 37℃消化，计数观察细胞增殖情况。

9.2.4.4 细胞 DNA 合成测定

胸腺嘧啶核苷(TdR)是 DNA 合成的必需物质，用同位素 ^{3}H 标记 TdR(^{3}H-TdR)作为 DNA 合成的前体掺入 DNA 合成代谢过程，通过测定细胞的放射性强度，反映细胞 DNA 合成代谢及细胞增殖的情况(司徒镇强等 2004)。

1) 试剂材料

(1) 含 10% FBS 的培养液，HBSS 缓冲液。

(2) 3.7×10^8Bq/ml HBSS 配制的 ^{3}H-TdR。

(3) 10% 三氯醋酸(TCA)，甲醇。

(4) 0.3 Eq 1% SDS 配制的 NaOH。

(5) 闪烁液、液体闪烁计数仪。

2) 步骤

(1) 取对数生长期细胞，制成 3×10^5 个/ml 的细胞悬液，每孔 1ml 接种于 24 孔板，37℃、5% CO_2 饱和湿度环境培养一定时间。

(2) 在细胞处于对数生长期时，每孔加 100μl ^{3}H-TdR。根据实验要求继续培养 1~24h。

(3) 终止培养，小心吸弃上清，用 HBSS 漂洗细胞 2 次，然后加 2ml 预冷的 10% TCA，放置 10min。如果细胞松散，应先用甲醇固定 10min。

(4) 用 10% TCA 重复洗 2 次，每次 5min。

(5) 每孔加 0.5ml 0.3Eq NaOH 于 60℃处理 30min，然后冷至室温。

(6) 收集裂解液于闪烁瓶中，加 5ml 闪烁液，用液体闪烁计数仪测定每分脉冲数(cpm)，结果以 cpm/10^6 表示。

9.2.4.5 细胞功能测定

主要通过检测培养物中的细胞外基质成分来确定软骨细胞是否维持软骨细胞的特征和功能。酸性糖胺多糖、II 型和 X 型胶原是软骨细胞的特征性分泌产物。可以用组织化学甲苯胺蓝染色法以及 II 型或 X 型胶原的抗体做免疫细胞化学染色，来对细胞的生物学特征和功能做检测。方法见前面章节。

9.2.4.6 构建体大小测定

可用电镜影像测定和计算机分析。

9.3 干细胞与皮肤组织工程

皮肤为人体最大的组织器官，是与外界环境接触的屏障。皮肤覆盖于身体表面，对人体有保护作用，同时它参与免疫反应和维持内环境稳定等重要功能。皮肤是第一个应用于临床的组织工程化组织。它的目的就是要构建出一种理想的皮肤替代物来解决临床移植供皮不足的问题。

目前皮肤替代物可分为三类：一类是仅有表皮类似物；另一类是成纤维细胞和胶原等细胞外基质成分构成的真皮替代物；第三类是由表皮和真皮构成的复合皮肤替代物。现在已经有很多商业化的皮肤替代物，如 Dermagraft-TM、Dermagraft-TC 以及 Apligraft super(TM)等，但是它们的价格昂贵，不适宜于广泛的试验研究。本节以复合皮肤替代物为例做一个简单的构建描述。

9.3.1 皮肤细胞培养

皮肤由表皮与真皮两个部分组成。表皮属于复层鳞状上皮，其细胞构成绝大部分是角质形成细胞(keratinocyte，又称角朊细胞)。在表皮细胞的组成中，只有来自皮肤基底层的角质形成细胞和黑色素细胞才具有增殖生长力，为维持表皮的完整性不断地提供分化细胞，其余各种细胞都经过终末分化，不再增殖。

真皮部分细胞构成主要是成纤维细胞，组织工程皮肤所需的成纤维细胞大都来源于人体的皮肤，以幼儿的包皮或终止妊娠的胎儿皮肤为佳，成纤维细胞具有较强的生长繁殖能力，是最容易培养的细胞类型之一，一般正常条件下就能培养成功。

目前角质形成细胞的体外培养技术是在 Rheinwald 和 Green 于 1975 年创立的饲养层细胞培养法的基础上逐渐发展起来的。饲养层细胞主要是射线照射或丝裂霉素 C 处理的 3T3 细胞或者成纤维细胞。

9.3.1.1 试剂材料

(1) 成纤维细胞培养基：10% 小牛血清；DMEM；100U/ml 青霉素；100U/ml 链霉素。

(2) 角质形成细胞有血清培养基：DMEM 与 Ham F12 的混合培养基(按 3∶1 的体积比例混合)；10% 新生小牛血清；4mmol/L *L*-谷氨酰胺；0.4μg/ml 氢化可的松；10^{-10}mol/L 霍乱毒素；5μg/ml 转铁蛋白；1.8×10^{-4} mol/L 腺嘌呤；2×10^{-11}mol/L 三碘甲状腺原氨酸；5μg/ml 胰岛素；10ng/ml 表皮生长因子(EGF)；100U/ml 青霉素；100U/ml 链霉素。

(3) 角质形成细胞无血清培养基：MCDB153 无血清培养基；0.15ng/ml 表皮生长因子；25μg/ml 牛垂体提取物。

(4) 消化酶液：Dispase 酶液(浓度 2mg/ml，成纤维细胞培养基配制)；胰蛋白酶液(0.25%，含 0.02% EDTA，无钙镁离子 PBS 配制)。

(5) 黑色素细胞培养基有两种：

a. MCDB153 无血清培养基；4%胎牛血清；0.5μg/ml 转铁蛋白；5μg/ml 胰岛素；100U/ml 青霉素；100U/ml 链霉素；0.6ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子；17ng/ml a-黑色素细胞刺激素；2.5ng/ml 内皮素-1；1μg/ml 维生素 E。

b. MCDB 153 无血清培养基；2mmol/L $CaCl_2$；Leibovitz's L-15 以 4：1(*V*/*V*)比例添加；2% 胎牛血清；5μg/ml 胰岛素；5ng/ml 表皮生长因子；10ng/ml TPA；40μg/ml 牛垂体提取液。

9.3.1.2 成纤维细胞的分离培养

成纤维细胞体外培养技术已经很成熟。常用培养方法有组织块贴瓶法和酶消化法。组织块贴瓶法进行原代培养时是把小的皮肤块植于培养瓶(皿)壁上，当组织周边沿生的细胞相互接触形成单层时，消化这些细胞后获得原代细胞；酶消化培养法是先用消化酶如胶原酶、胰蛋白酶等对组织进行消化后获得单细胞悬液，然后接种获得原代细胞。组织块培养难以贴瓶，轻微振动会使组织块不易贴壁，培养基的波动作用也会影响组织块培养。下面我们介绍成纤维细胞的酶消化培养法。

(1) 取人环切包皮，去除皮下组织，乙醇消毒，用 PBS 漂洗几次。

(2) 置于 0.5% Dispase 蛋白酶中或者 0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA 溶液的小瓶中，于 4℃消化过夜。

(3) 以镊子剥除表皮层，将分离的真皮组织充分剪碎，加入 0.1%胶原酶溶液，于 37℃消化 8~10h。

(4) 用吸管反复吹打组织块，分散细胞。细胞悬液经 100 目筛网过滤，离心(800*g*×10min)。

(5) 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞，计数，按 5×10^5 个/cm^2 密度种入培养瓶，置于培养箱(37℃、5% CO_2)。

(6) 培养 24h 后更换培养液。此后每 2~3 天换液一次。

9.3.1.3 角质形成细胞的分离培养(Medalie et al. 1999, Boyce et al. 1999)

1) 饲养层细胞的处理

3T3 或者成纤维细胞的处理向对数生长期的 3T3 细胞或者成纤维细胞内加入丝裂霉素 C(1~10μg/ml)，37℃下培养 4h 后，弃掉培养液，用 PBS 洗 3 次，经 0.25% 胰蛋白酶消化后，分离出细胞，用血球计数板计数，接种于含有角质形成细胞培养基的培养皿内，接种密度为 2×10^4~5×10^4 个/cm^2。

2) 角质形成细胞的原代培养

(1) 外科切取儿童包皮或者干尸皮肤，用乙醇消毒，晾干。

(2) 分离皮肤和皮下组织，去除脂肪和疏松结缔组织。

(3) 用手术刀将皮肤切成 1~2cm 长的细薄条。

(4) 加入 Dispase 消化液，在 4℃下过夜或 37℃下消化 2~4h。

(5) 肉眼可见皮肤边缘表皮发生分离时，将表皮面向下，小心地将表皮与真皮剥离开。

(6) 将表皮用胰蛋白酶液 37℃快速振荡消化 1min，随后加入含 10% FBS 的 DMEM 终止消化。

(7) 用灭菌的纱布过滤去处组织块，细胞液 300g 离心 5min。

(8) 用角质形成细胞培养液重悬沉淀细胞，以 2×10^4~5×10^4 个/cm^2 密度种植于饲养层细胞上。

3) 角质形成细胞的常规培养

(1) 每周换液 2 次，原代培养 10~14 天后将会达到 70%~80%的融合。

(2) 将细胞孵育在胰蛋白酶和 EDTA 消化液中，37℃消化 10~15min，随后用力吹打使细胞从培养瓶脱离下来。

(3) 离心、漂洗、计数，再以 5×10^3~50×10^3 个/cm^2 密度种植于新鲜的饲养层上。

4) 角质形成细胞的鉴定

角质形成细胞具有很强的集落克隆形成能力，培养 3 天后即可形成集落，10 天左右即可汇合成片。角蛋白 19 和 p63 转录因子可以作为角质形成细胞的表面标志对其进行免疫细胞化学鉴定。角质形成细胞培养的角质形成细胞可能含有成纤维细胞，可用波形蛋白(Vimentin，中胚层来源细胞的标志)和角质细胞生长因子(keratinocyte grow factor，KGF)来检测。成纤维细胞表达 Vimentin 和 KGF，而角质形成细胞不表达 KGF。

9.3.1.4 黑色素细胞的分离培养(Hsu et al. 1996)

(1) 用前面同样方法将表皮与真皮分离。

(2) 收集表皮，0.25% 胰酶消化 10min，反复吹打以获得单细胞悬液。

(3) 用角质形成细胞培养基接种培养 3 天，然后将培养液更换为黑色素细胞培养液。

(4) 每 2~3 天换液一次。原代细胞长满 70%~80%时，胰酶消化传代。

9.3.1.5 黑色素细胞的鉴定

一般培养 2 天后即可看见黑色素细胞，细胞呈梭形或多角形，呈现树突状，随着生长更为明显。

黑色素细胞能够产生黑色素，多巴胺染色可见细胞质内呈现黑色或灰色颗粒，透射电镜观察也可看见细胞质内有黑色素颗粒。

9.3.2 皮肤组织工程支架材料

皮肤目前常用的支架材料主要有以下几种：成纤维细胞等饲养层细胞；聚乌拉坦、聚乳酸等合成材料；胶原、透明质酸、纤维蛋白胶等细胞外基质；脱细胞真皮等。脱细胞真皮已经商业化，如 AlloDerm、Integra 等。脱细胞真皮有多种制备方法，下面介绍一下常用脱细胞真皮的制作方法。

9.3.2.1 冻融法制作脱细胞真皮

1) 方法一

(1) 将前面所述分离的真皮切成大小适中的小块。

(2) 将真皮块放入液氮中冷冻，随后取出复温。

(3) 如此在–80℃和37℃下反复冻融4~10次后(目的是去除存活的细胞成分，剩下的将是一个以胶原纤维网架为主的真皮组织)，再放入–80℃下冷冻保存。

2) 方法二

(1) 用采皮机采尸体皮肤或新鲜皮肤，置于消毒的容器中冻存备用。

(2) 制备去细胞真皮时将冷冻皮取出，复温，再入液氮冷冻。

(3) 如此接连几个冻融过程，然后用灭菌的PBS洗涤几次，再用含有多种抗生素的PBS于37℃孵箱中孵育一周。

(4) 一周后取出冷冻皮，用镊子将表皮从真皮上轻轻剥离或刮去，余下未去除的表皮会在随后一周左右的时间自然脱去。

(5) 将真皮放入含有多种抗生素的PBS中于4℃放置4周或更长的时间以去除可能还有的存活细胞。

(6) 使用前，脱细胞真皮用DMEM洗涤3次。

9.3.2.2 化学试剂消化酶混合法制作脱细胞真皮(杨志明 2002)

1) 试剂

0.5% SDS(含有0.02% NaN_3)、1mol/L NaCl(含有0.02% NaN_3)、0.1%戊二醛、0.25%胰蛋白酶溶液、PBS溶液(含有100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、100μg/ml庆大霉素、10μg/ml环丙沙星和2.5μg/ml两性霉素)。

2) 制备

(1) 皮肤来源同前。

(2) 将皮肤用加入多种抗生素的PBS溶液清洗干净，切成大小适中的小块，浸于37℃ NaCl溶液中(溶液与皮肤体积比比例为100∶1)，振荡24h。

(3) 将脱表皮皮肤浸泡于0.1%戊二醛中交联5~10min，用PBS冲洗干净。随后将其浸泡于0.5% SDS溶液中，连续摇动1~2h，用PBS溶液冲洗干净。

(4) 0.2%胰蛋白酶溶液中消化30min，PBS溶液冲洗。

(5) 冷冻干燥后可4℃保存。

9.3.3 复合皮肤构建(鄂征等 2003, Medalie et al. 1999)

9.3.3.1 角质形成细胞-脱细胞真皮皮肤的构建

(1) 将脱细胞真皮放入组织培养皿中，真皮乳头面朝上，加入少量培养液，37℃培养1h。

(2) 将角质形成细胞用胰蛋白酶消化离心，洗涤后轻轻滴种于真皮块上，37℃孵育2h使细胞贴壁，随后加入培养基浸没角质形成细胞-脱细胞真皮复合物。此后每3天换液一次。

(3) 浸没培养角质形成细胞-脱细胞真皮复合物3天后，用玻璃器具或其他无菌不锈钢器具，将复合物轻轻托起，离开培养皿底。慢慢加入新鲜培养液，以和复合物表面平齐不超过为准，将角质形成细胞层暴露于空气中，形成气-液培养界面层。

(4) 如此培养至少 1 周，将会在真皮乳头面上形成一个具有多层角质形成细胞的上皮膜。此复合皮肤可以进行动物移植。

9.3.3.2 角质形成细胞-黑色素细胞-真皮替代物复合皮肤的构建

真皮替代物现在种类比较多，例如，聚乳聚羟基乙酸共聚物(PLGA)、胶原凝胶、胶原-黏多糖海绵和胶原冻干膜等。我们以胶原为例介绍复合皮肤的构建。

(1) 胶原凝胶的制备：在无菌条件下，用乙酸溶液按 8g/L 的浓度配制胶原，并加入血清和 10×DMEM，用 1mol/L 的 NaOH 调节的胶原的 pH 至 7.2，冰块保存备用。

(2) 成纤维细胞达 80%~90%汇合生长时以 0.25%胰酶溶液消化，按 2×10^5 个/cm^2 密度种于培养板中的胶原膜上。加入成纤维细胞培养液于 37℃、5%CO_2 条件下继续培养 4 天。

(3) 将胶原膜反转，在胶原膜的另一面以 2~3 倍成纤维细胞密度将角质形成细胞和黑色素细胞悬液(比例为 30∶1)接种于上，换成角质形成细胞培养液进行培养。

(4) 继续培养 3 天，将细胞胶原复合体进行气-液界面培养，隔日更换培养液，培养 14~17 天后即可用于移植实验。

9.3.4 动物移植试验

(1) BALB/c 裸鼠，2%戊巴比妥钠(30~50mg/kg)腹腔注射麻醉。

(2) 70% 乙醇擦洗鼠背，随后再用聚维酮碘(Betadine)消毒。

(3) 在裸鼠背部切取全层皮作圆形创面(区域要小于待移植的复合皮肤)以供皮肤移植。

(4) 取上述组织工程化的复合皮肤，覆盖创面，用 6-0 线缝合，加压包扎。

(5) 移植 6 周后基本上已能长出完全分化、具有色素上皮和表皮基底层的皮肤组织来。

9.4 干细胞与肌腱组织工程

肌腱缺损是临床工作中经常遇到的难题。自 19 世纪以来，研究者们就开始了肌腱的缺损修复和功能重建研究。目前主要采用异体肌腱、自体肌腱、人工材料等多种方法修复此类缺损。由于自体肌腱来源有限，异体肌腱存在免疫排斥反应问题，人工肌腱也存在免疫排斥反应以及不能作为永久性替代，组织工程化的肌腱修复逐渐成为研究的热点。组织工程化肌腱将是未来理想的肌腱替代物。目前组织工程化肌腱的体内构建已经取得了一定的进展，但目前国际上尚未有在体外成功构建组织工程化肌腱的报道。本部分内容以肌腱细胞作为种子细胞，对体外构建肌腱的实验技术做初步的介绍。

9.4.1 肌腱细胞的分离培养

目前在肌腱组织工程中研究的种子细胞有肌腱细胞、皮肤成纤维细胞和骨髓间充质

干细胞。肌腱组织工程种子细胞的来源之一为胚胎肌腱组织分离纯化获得的肌腱细胞。蔚芃等(1995)完成了人胚肌腱细胞的分离、纯化、培养及冻存方法，成功建立了人胚肌腱细胞系。张前法等(1997)也建立了兔的肌腱细胞的分离培养方法。

由于骨髓间充质干细胞体外具有多向分化的潜能，所以也有研究者用其作为肌腱组织工程的种子细胞。Awad 等(1999)分离培养骨髓间充质干细胞后与胶原复合形成细胞胶原复合物植入手术肌腱缺损处，与单纯应用胶原组进行比较，发现其力学特性有很大的提高，而在组织学和形态学方面两者并没有很大差别，说明骨髓间充质干细胞作为种子细胞还需进一步深入的研究。现在尚没有成熟的方法直接诱导骨髓间充质干细胞分化为肌腱细胞。

现在也有用其他细胞替代肌腱细胞，如成纤维细胞，两者形态类似，并且在肌腱损伤修复过程中成纤维细胞起着重要的作用。成纤维细胞分布广泛、取材容易，但培养中发现成纤维细胞与肌腱细胞虽然在形态上类似，但在贴壁时间、排列方式、细胞生物学特性等方面均有所不同。在应力作用下成纤维细胞特性是否有所改变也有待进一步研究，因此用于种子细胞还不成熟。

9.4.1.1 人胚肌腱细胞的分离培养

1) 试剂

F12 培养基、10%新生小牛血清、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素。

2) 方法

(1) 肌腱取自于 3~5月龄意外流产胎儿四肢，75% 乙醇消毒，剪除肌腱外膜组织，PBS 液洗涤 3 次。

(2) 将肌腱段剪成 1~2mm^3 块，用 0.25% 胰蛋白酶和 0.1% 胶原酶于 37℃ 消化 2~4h，中间摇动 2~3 次。

(3) 用含 10% 新生小牛血清和抗生素的 F12 培养基中止消化，80 目尼龙筛网过滤除去碎块。

(4) 滤液 500*g* 离心 10min，弃上清。用培养基洗涤沉淀一次。

(5) 用完全培养基重悬细胞，计数，按 10^5 个/ml 接种于培养瓶中。

(6) 原代培养的人胚肌腱细胞达到 80% 融合后进行常规传代培养。

9.4.1.2 兔肌腱细胞的分离培养

1) 试剂

F12 培养基、10% 新生小牛血清、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素。

2) 方法

(1) 切取新西兰白兔后肢屈趾肌腱，在放大镜下去除肌腱外膜组织；D-Hank 缓冲液洗涤 3 次。

(2) 用 0.25%胰蛋白酶及 0.1%胶原酶将整段肌腱于 37℃ 消化 20min。

(3) 用完全培养基终止消化，D-Hank 缓冲液洗涤 3 次。

(4) 将肌腱剪成 1~2mm^3 块，用 0.25% 胰蛋白酶和 0.1% 胶原酶于 37℃ 消化 1h。

(5) 用完全培养基终止消化，200 目滤网过滤除去碎块。

(6) 滤液以 1000g 离心 10min，弃上清。

(7) 用培养基洗涤沉淀一次，再重悬细胞，计数，按 10^5 个/ml 接种于培养瓶中。

9.4.1.3 肌腱细胞的形态特征及鉴定

1) 细胞形态

刚分离出的人腱细胞呈圆形，有很强的折光性。48h 后大部分细胞贴壁，贴壁生长后形态呈梭形，细胞两极突起较长(杨志明 2004)。

2) 特征鉴定

肌腱是由胶原束、肌腱胶质和肌腱细胞组成，具有 I 型胶原的合成能力，因此可以检测 I 型胶原和胶原的特征蛋白羟脯氨酸来鉴定(项舟等 2000)。

(1) 羟脯氨酸含量测定：选择原代或传代细胞，每代以 10 瓶为一组，定量接种细胞及加入培养基培养 7 天，完全培养基为空白对照组。用自动生化分析仪测定培养液中的羟脯氨酸含量。

(2) I 型胶原检测：将传代的肌腱细胞种于放有载玻片的培养瓶中做成细胞爬片，培养一周后用免疫细胞化学的方法对 I 型胶原进行染色鉴定。

9.4.2 组织工程化肌腱的支架材料

肌腱组织工程应用的支架材料主要有天然高分子材料和合成高分子材料两大类。天然高分子材料，如胶原纤维、弹性蛋白以及壳聚糖等，具有组织正常的网架结构，组织相容性好，是一种较为理想的组织工程支架材料。但由于天然高分子材料存在强度和加工性能较差、降解速度无法控制、重复性差等缺陷，其应用还是有限。

合成高分子材料目前国内外使用较多的有 PGA、PLA、PCL、PLGA 等。这些材料具有强度高、易加工、降解速度可控等优点，广泛应用于组织工程领域。但合成高分子材料细胞相容性不如天然材料，其亲水性差，细胞黏附性弱。由于单纯材料理化性质的限制，研究者们将多种材料进行复合处理形成复合材料，以改善独自使用的缺陷。杨志明领导的研究小组采用了多种复合材料，如碳纤维与 PGA、胶原与 PGA 复合、经过处理的人发与 PGA 复合等作为肌腱的支架材料，证实新形成肌腱的力学性能和肌腱细胞的附着力均明显提高，体内植入 3 个月后，组织工程肌腱的抗拉强度可达到天然肌腱的 75%，肌腱细胞分泌的胶原也明显增加(Yang et al. 2000)。

随着对材料研究的深入，人们发现对材料表面进行物理、化学等的修饰会明显的改善材料对细胞的亲和力，促进细胞的黏附、生长、增殖和分化。目前，对材料的修饰主要是将一些蛋白质、多肽、细胞因子和生长因子等用不同的方法固定、涂抹于材料的表面，充当细胞的黏附基底，从而促进细胞的黏附生长。目前肌腱组织工程在这方面的研究较少，有待进一步的研究深入。

9.4.3 肌腱细胞和支架材料的复合培养

复合支架材料的研究已取得了一定的进展，但仍然不能确定哪一种材料最适合肌腱

的组织工程化应用。下面我们以 PGA 为支架材料描述 Leghorn 鸡肌腱细胞和材料复合培养实验技术。

9.4.3.1 试剂材料

DMEM 培养基、10% 新生小牛血清、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素、PBS 缓冲液、0.25% II 型胶原酶、0.25% 胰蛋白酶、PGA 支架材料、Maxon 可吸收缝合线、Leghorn鸡。

9.4.3.2 方法

1) 肌腱细胞的分离培养

(1) 无菌状态下切取 Leghorn 鸡 II~IV 趾深屈肌腱，将肌腱组织剪成 1~2mm^3 的组织块，于离心管中 PBS 洗 3 遍。

(2) 加入 0.2% 的 II 型胶原酶，于 37℃摇床摇动消化，分别于 4h、5h、7h 收取肌腱细胞。

(3) 收取细胞时，以 200 目滤器去除组织碎块，滤液 1000r/min 离心 5min。弃上清，加 PBS 重悬细胞洗涤 1 次。

(4) 加入含 10% FCS 的 DMEM 培养基重悬细胞，接种于培养瓶。

(5) 置入 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

(6) 每 2~3 天换液一次，当肌腱细胞达 80%~90% 融合时，进行细胞的常规传代培养。

2) 支架材料的制备

(1) 取 PGA 编织网剪裁为 1.5cm×0.6cm 大小，弯曲后用 Maxon 缝线将其缝制为长度为 0.5cm 的圆柱状三维支架。

(2) 75% 乙醇中浸泡消毒灭菌 1~2h。

(3) 用 PBS 洗涤几遍，再用培养基洗涤一遍，与肌腱细胞复合培养前用培养基浸泡 12h。

3) 肌腱细胞与支架材料复合培养

(1) 将肌腱细胞用培养基制成浓度 5×10^6 个/ml 的细胞悬液。

(2) 支架材料预置在 6 孔板或 24 孔板中，将肌腱细胞缓慢滴加接种于材料上。

(3) 置入 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中孵育培养 4~6h。

(4) 添加适量培养基，于培养箱中继续培养 7 天，隔日换液 1 次。

4) 应力场刺激培养

肌腱细胞和支架材料复合培养 48h 后置于应力场刺激培养，杨志明等(2002)初步预实验表明，对细胞支架复合体施以 10% 应变、频率 0.2Hz、每小时加载 15min，共作用 48h 的加载条件，适合肌腱细胞生长而不致引起细胞死亡。

5) 培养观察

(1) 倒置显微镜观察：在倒置显微镜下观察细胞与材料的黏附和在材料上的生长情况。

(2) 扫描电镜观察：

a. 将材料从培养基中移出，在 37℃条件下，用 PBS 轻洗 1 遍。

b. 3% 戊二醛溶液 4℃固定 1h，PBS 冲洗 3 遍。

c. 1% 锇酸固定液 4℃固定 2h，PBS 冲洗 3 遍。

d. 50%、70%、80%、90%、95%梯度乙醇逐级脱水。

e. 临界点干燥、喷金，扫描电镜观察。

9.4.4 动物实验

(1) 取 12 月龄雌性 Leghorn 鸡 20 只，2.5% 戊巴比妥钠麻醉，常规消毒。

(2) 将每只鸡左右两侧足第二趾深屈肌腱切断，并造成缺损，约 1.5cm 长。

(3) 用体外构建的组织工程化肌腱桥接缺损区，断端用 5-0 无创伤肌腱缝合线做改良 Kessler 法缝合。

(4) 术后第二趾屈曲位固定 5 天。分笼饲养，自由进食。分别于术后 2 周、4 周、6 周、8 周取材制备标本。

9.4.5 检测方法

9.4.5.1 扫描电镜观察

同前。观察支架材料复合细胞前后形态变化。

9.4.5.2 组织学观察

将标本用 10% 中性福尔马林液固定，石蜡包埋，切片，HE 染色和 Masson trichrome 染色进行组织学变化观察。

Masson trichrome 染色方法：

(1) 常规将切片脱蜡至水。

(2) 入 1% 丽春红染液 3min。

(3) 1% 乙酸水溶液分色。

(4) 1% 磷钼酸水溶液染 5min 后入蒸馏水洗。

(5) 1% 甲基蓝染液 2min，入蒸馏水洗。

(6) 梯度乙醇快速脱水。

(7) 二甲苯透明，中性树胶封固。

9.4.5.3 生物力学测定

采用 INSTRON 生物力学测定仪测定肌腱组织的抗拉力。在室温、生理盐水润湿条件下，测定其抗拉强度、最大断裂能量和最大断裂应变。加载速度为 5mm/min，载荷下降 90%时停止加载。每标本测试前均以 IN 反复牵拉 10 次，使标本较原来长度延长 0.5mm 左右以预调。

9.4.5.4 I 型胶原含量测定

用免疫组织化学方法。

(1) 石蜡切片常规脱蜡。

(2) 0.3%过氧化氢孵育 5min。
(3) 蒸馏水冲洗 2 次，每次 5min。
(4) 5% 正常山羊血清室温封闭 10min。
(5) 倾去血清，加入兔抗鸡 I 型胶原抗体 4℃孵育过夜。
(6) PBS 冲洗 3 次，每次 5min。
(7) 滴加生物素标记的二抗，孵育 30min。
(8) PBS 冲洗 3 次，每次 5min。
(9) 辣根过氧化物酶标记的连霉卵白素孵育 10min。
(10) PBS 冲洗 3 次，每次 5min。
(11) DAB 显色，苏木素复染封片。

(管利东　裴雪涛)

9.5 干细胞与心肌组织工程

肌肉组织又称肌组织，是由中胚层来源的具有收缩能力的肌细胞。肌细胞为细长形，故常被称为肌纤维。在肌细胞内存在大量的细丝状的肌原纤维。根据肌肉组织的形态和功能特点，可将其分为骨骼肌、心肌和平滑肌三种。与此相应的，肌细胞也分为三种，即骨骼肌细胞、心肌细胞和平滑肌细胞。由这些肌细胞构成的组织也各不相同，分布在身体的不同部位，行使着不同功能，它们之间是严格区分，不可相互替代的。根据组织工程所使用的种子细胞和构建组织的特点的不同，分别称为心肌组织工程、骨骼肌组织工程和平滑肌组织工程。心肌组织工程发展相对较快，并且所使用的方法可为骨骼肌组织工程和平滑肌组织工程所借鉴。本文即以心肌组织工程为例，描述其所使用的一般方法。

9.5.1 心肌组织工程

心肌疾患目前已经成为工业化社会引起死亡的头号杀手，心肌梗死和心衰会导致患者大面积的心脏组织发生病理性改变。由于心肌细胞为高度分化的终末细胞，因此心梗一旦发生，很难逆转。传统治疗心衰的方法主要是药物治疗，但治标不治本。晚期心功能衰竭的患者只能进行心脏移植治疗，但因心脏移植供体缺乏等因素的限制而难以广泛应用。另外，先天性心脏病也是一个被全球关注的疾病，影响到大约 1%的婴儿，发病率和病死率均较高。因此，迫切需要寻找新的方法治疗心肌疾患。

心肌组织工程学的兴起给治疗心肌疾患带来新的希望。心肌组织工程运用细胞生物学、生物材料学和工程学的原理，将具有心肌组织形成能力的种子细胞与具有良好的生物相容性、可降解性和一定的生物力学特性的支架材料复合，体外构建具有天然心肌组织特征的工程化心肌组织，用于损伤心肌的修复。心肌组织工程研究成功与否主要取决于以下三个关键性制约因素：种子细胞、支架材料以及有助于细胞生长、分化的外在环境。其中获得足够数量、不引起免疫排斥反应且具有再生活力的心肌细胞是开展组织工

程研究的前提和基础，心肌细胞支架材料又是种子细胞发挥生物学作用赖以生存的根本，对再造人体心肌的质量具有重要影响。适宜的体外培养环境对细胞——支架复合体进一步发育成人体心肌组织也发挥着重要作用。

近年来，经过人们不懈的努力，心肌组织工程研究取得了一系列重要的进展，正在逐渐显示出诱人的前景。目前，人们已经采用不同的策略在实验室构建出具有天然心肌组织特有的组织学、力学和电生理学特征，而且体内移植后可存活和血管化。有关这些工程化组织用于心肌发育、心肌电生理和作为药物筛选模型的研究也正在进行中。本节主要描述了心肌组织工程研究中的一般操作方法，分为种子细胞的选择、支持材料的准备、工程化心肌组织的构建和生物反应器的结构和使用四个部分进行描述。

9.5.2 种子细胞的选择

目前国内外开展心肌组织工程研究所选用的种子细胞主要有胚胎心肌细胞、骨骼肌成肌细胞、骨髓干细胞、平滑肌细胞、人类胚胎干细胞、成纤维细胞和克隆的细胞等。理论上，心肌细胞其天然的结构、收缩特性和电生理特性应是理想的供体细胞类型，因此，它是目前开展心肌组织工程研究和进行心肌修复研究中最广泛使用的种子细胞。然而心肌细胞获得和扩增都很困难，尤其在应用于临床时，不可能直接获取被治疗者心肌细胞进行心肌组织构建，用其他动物的心肌细胞构建的心肌组织在治疗时又存在着免疫排斥问题。因此，寻找新的种子细胞对于心肌组织修复至关重要。

当今，心肌缺损治疗中最广泛使用的细胞类型是骨骼肌来源的成肌细胞和骨髓单核细胞。这两种细胞类型都是自体的，且易于获得和扩增。用患者自体骨骼肌成肌细胞修复心肌缺损实验已明显的改善了心脏的收缩功能，但成肌细胞的限制在于它们不能转分化为心肌细胞或内皮细胞。相比较而言，骨髓来源的干细胞因其具有可塑性现在越来越受欢迎，在靶器官处的环境中可以实现细胞表型的改变，并且也可使用患者自身细胞，避免免疫排斥问题。近年来，有关这方面的研究报道越来越多。

胚胎干细胞具有无限增值和全能分化潜能，自发条件下即可向心肌细胞分化，某些化学物质和生化物质促进其向心肌细胞分化，分化来的心肌细胞采用 Percoll 梯度离心进行富集；采用基因工程的方法可以得到纯度为 99%的心肌细胞。胚胎干细胞来源的细胞能够发育成天然的成熟细胞，并且随着治疗性克隆研究的进展胚胎干细胞来源的心肌细胞的免疫排斥问题可能得到解决，因此胚胎干细胞有望成为心肌组织工程主要的细胞来源。本实验就如何获得心脏来源的心肌细胞、骨骼肌成肌细胞和胚胎干细胞分化来的心肌细胞实验步骤进行描述。

9.5.2.1 心脏心肌细胞的分离

临床应用中，人类心肌细胞可能是最合适的细胞来源。来自活检、供体器官或者不要的组织获得的自体或异体细胞在构建生物合成移植物方面都有应用价值。目前，在组织工程研究最常使用的是动物模型，其中新生大鼠心室肌细胞是最常使用的细胞。下面的细胞分离方法是专为分离 2 日龄大鼠心室肌心肌细胞而设计的，当然，这一方法也适用于其他分离系统。

1) 材料和试剂

(1) 动物：2 日龄大鼠；

(2) 水浴加热摇床；

(3) 无菌培养瓶；

(4) 细菌级培养皿，100ml；

(5) 无菌手术器械(镊子和剪刀)；

(6) 无菌的无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 Hank 平衡盐溶液，加入 HEPES(10mmol/L)使其 pH7.4(HBSSH)；

(7) 生长培养基(参见培养基的选择)；

(8) 两个 250ml 的烧杯，一瓶 75%乙醇；

(9) 用 PBS 配制的 0.1%的胰酶溶液，使用前新鲜配制；

(10) 无菌棉球或小纱布块；

(11) 无菌 50ml 的离心管；

(12) 细胞支持材料(如培养皿、微载体、胶原或聚乳酸缝线、盖玻片等)，前一天用纤维蛋白原包被(参见支持材料的准备)；

(13) 无菌吸管，1ml、10ml、25ml；

(14) 血细胞计数器或别的细胞计数器；

(15) 50ml 的离心管；

(16) Falcon 细胞滤网。

2) 步骤

注意：动物应根据当地动物保护和使用委员会(IACUC)制定的手册进行处置。

(1) 在 100ml 的培养皿加入 25ml 无菌的 HBSSH，用于放置解剖的心脏。

(2) 把解剖器械放入盛有 75% 乙醇的烧杯中。

(3) 用 75%的酒精棉球或纱布擦拭层流间工作区。

(4) 根据当地 IACUC 手册，麻醉动物并使其安乐死。安乐死后要快速进行解剖。

(5) 用 75%的酒精棉球或纱布擦拭动物腹部(从颈部到小腹)。

(6) 用利剪在大鼠的腋窝处沿胸部剪一个横向切口。

(7) 用镊子快速而细致的取出心脏，放入含有 HBSSH 的培养皿中。

(8) 处理尸体。

(9) 在无菌水中清洗解剖器械，放回 75% 乙醇中。

(10) 重复步骤(3)~(9)直到取完心脏。整个过程要无菌操作。

(11) 检查每一颗心脏，清除任何肺组织或别的非心肌组织。

(12) 将组织移入 100mm 的干净而干燥培养皿中，剪碎成 1~2mm^3 大小。这一步很关键：组织剪得太碎会导致在下面的清洗过程中丢失细胞，太粗消化后细胞还留在残余的组织中。

(13) 加入无菌的 HBSSH，用吸管将剪碎的组织块和液体一同吸入培养瓶中。

(14) 轻轻吹打组织块洗去血细胞和碎片，轻轻倒掉漂洗液，组织块留在旋转瓶中。

(15) 在剪碎的组织中加入 10 倍体积的 0.1%的胰酶消化液，放入 37℃、140r/min 的水浴中孵育 8min。把酶液倒入不用的烧杯中。

(16) 重复步骤(15)一次。前两步主要是血细胞，弃之。

(17) 将 10 倍体积的 0.1%的胰酶消化液加入剪碎的组织中，放入 37℃、140r/min 的水浴中孵育 8min。将酶液吸入含有 1ml 生长培养基的 10ml 的离心管中。

(18) 重复步骤(17)，直到组织块消化完全。

(19) 用滤网过滤去除未分散的组织块。

(20) 1200r/min 离心 4min，收集细胞。离心结束时，倾倒出上清，当心不要晃动细胞团沉淀物。加入生长培养基重悬细胞。

(21) 用血细胞计数器或细胞计数器统计台盼蓝着色细胞。

(22) 用生长培养基将细胞稀释到 1×10^6 个/ml。

9.5.2.2 胚胎干细胞来源的心肌细胞的获得

胚胎干细胞主要来自建系的细胞系，可以购买或别的实验室惠赠。采用合适的诱导剂和基因工程方法都可获得分化效率较高的心肌细胞。相比较而言，采用诱导剂进行诱导比较简单，易于操作，分化来的心肌细胞安全，比较适合作为心肌组织工程的种子细胞。本方法主要适用于采用诱导剂诱导获得心肌细胞的方法。

胚胎干细胞扩增至足够使用的量后，在悬浮培养皿中形成拟胚体，低密度接种在细胞培养皿中，并加入诱导剂进行诱导。分化来的心肌细胞用 Percoll 密度梯度离心的方法进行富集(Xu et al. 2002)。

1) 材料和试剂

(1) 胚胎干细胞；

(2) 10mm、15mm 的组织培养皿、15mm 的细菌悬浮培养皿、10ml 的离心管；

(3) 生长培养基、诱导液 DMSO、抗坏血酸等；

(4) 相差显微镜；

(5) 58.5% 和 40.5% 的 Percoll 液；

(6) 0.25% 胰酶+0.02% EDTA 的消化液；

(7) 0.1%的胶原酶溶液、高 K^+液；

(8) 200 目的滤网；

(9) 离心机。

2) 步骤

(1) 胚胎干细胞在常规条件下进行扩增。

(2) 将胚胎干细胞接种悬浮培养皿进行悬浮培养，以形成拟胚体。

(3) 悬浮培养 5~9 天后，将拟胚体接种细胞培养皿，接种密度为 1~3 个/mm^2，并加入 DMSO 或抗坏血酸等诱导剂进行诱导。

(4) 经过 8~10 天的诱导分化，相差显微镜下可见跳动的心肌合胞体。

(5) 胰酶消化跳动的心肌合胞体 2~4min，或在镜下观察细胞开始成片脱落时，用生长培养基中止消化，并用吸管轻轻吹打细胞，使其脱落。细胞成片脱落。

(6) 将成片脱落细胞移入培养瓶中，吸去液体，尽量吸干净。加入胶原酶消化液，置于 37℃、5% CO_2 孵箱中孵育 20min。

(7) 轻轻吸去消化液，用无菌的 PBS 清洗细胞一次，加入高 K^+液，室温放置 10min

后，用吸管轻轻吹打分散细胞。

(8) 滤网过滤去除未消化的残渣，1200r/min、4min 离心收集细胞。

(9) 用生长培养基重悬细胞。

(10) 在 10ml 的离心管中，依次加入 58.5%的 Percoll 液 3ml，40.5%的 Percoll 液 3ml，细胞悬液 3ml，1500*g* 离心 30min。

(11) 细胞在 58.5%和 40.5%两种 Percoll 浓度液界面处形成细胞分离带，收集该带及之下的细胞，并用无菌的 PBS 清洗 3 次。

(12) 收集细胞，并用生长培养基重悬，制成所需浓度的细胞悬液。

9.5.3 心肌组织工程细胞支持材料的准备

细胞要三维生长，必须要有能为细胞提供生长支持支架材料。作为构建工程化心肌组织的支架材料主要包括两类：一类是合成的生物可降解聚合物，如聚乳酸等；另一类是为天然组织提供机械支持的生物大分子，如胶原等。研究人员应用聚酯类支架材料接种心肌细胞表明可形成心肌样组织，但也存在一些固有不足。相比较而言，天然生物性支架材料，如胶原、壳聚糖、海藻酸钠和凝胶等，因其良好的生物相容性而越来越受到科研人员的重视，近年来也相继采用这些支架构建出工程化的心肌组织(Zimmermann et al. 2000)。

随着生命科学和材料科学的相互渗透，研制新一代有特定修复功能的"智能支架材料"是组织工程学新的研究热点，其主要是通过将一些具有生理功能的蛋白质、多肽、酶生物学设计。这样，作为支架和生长因子固定在支架材料表面，从而针对材料表面进行分子的生物材料不仅能够为细胞提供机械的承载，而且要能够为其提供形成有功能的组织所需的化学和生物学的信号，引导细胞在支架中进行组织、生长和分化。

根据支架材料的存在形态可将其分为预制的支架和可溶性支架两类。预制支架包括各种生物材料制成的纤维网或多孔的泡沫等；可溶性支架，如液态胶原等。另外，日本科学家发明了一种无支架构建工程化组织的方法，但它需要借助一种温敏材料来形成单层心肌细胞片层。这些支架在使用时必须是无菌的，可采用乙醇浸泡、紫外照射等方法进行消毒，如高温高压或 ^{60}Co 照射不会使这些材料变性，最好采用这些方法进行灭菌。

9.5.3.1 预制生物支架材料的准备

(1) 用无菌的去离子水漂洗材料。

(2) 在 75%乙醇溶液中浸泡 24h。

(3) 用无菌的去离子水漂洗。

(4) 材料储存在无菌的 Dulbeccos 的磷酸盐缓冲液中。

(5) 准备市售的纤维蛋白原溶液：1mg 包装的纤维蛋白原中加入 10ml 无菌去离子水，数小时后使用以保证纤维蛋白原溶解，层粘连蛋白也可以同样的方式准备。

(6) 支持材料在 4℃市售纤维蛋白原溶液中浸泡 24h。

(7) 使用前用细胞培养液漂洗支持材料。

9.5.3.2 液态胶原支架的准备

从成年大或小鼠的鼠尾获取胶原，主要为I型。

1) 材料和试剂

(1) 成年大白鼠；

(2) 镊子、剪刀、止血钳、烧杯、平皿、离心管等；

(3) 75% 乙醇、0.1% 的无菌稀乙酸、无菌的 PBS；

(4) 离心机。

2) 步骤

(1) 成年大白鼠，引颈处死，从尾根部切断鼠尾，放入 75%乙醇中浸泡 30min。

(2) 用止血钳夹住鼠尾根部，撕去皮肤。

(3) 撕下白色尾腱，置于平皿中，用无菌的 PBS 清洗掉尾腱上的血污。

(4) 将尾腱剪碎成 2~3mm 长度。

(5) 取 1.5g 剪碎尾腱浸入 150ml 0.1%的乙酸溶液，至 4℃冰箱中，并不时摇动，48h 后，移入灭菌离心管中。

(6) 以 4000r/min 离心 30min，吸取上清液，–20℃保存。

9.5.3.3 温敏材料的制备

聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PIPAAm)在 37℃时心肌细胞在其上能够很好的贴附生长，但当温度降至 22℃时，细胞便同材料相分离(Zimmermann et al. 2000)。

1) 材料和试剂

(1) 异丙烯酰胺(IPAAm)单体、丙烯酰胺(AAm)单体、丙醇；

(2) 电子束激发器；

(3) 盖玻片、培养皿；

(4) 氮气、环氧乙烷、蒸馏水。

2) 步骤

(1) 将 IPAAm 单体溶于 2-异丙醇中，形成 IPAAm 溶液。

(2) 在聚异丙烯组织培养皿的表面铺上一层 IPAAm 溶液，并用电子束进行照射，使得单体聚合并共价铰链到培养皿的表面。

(3) 用冷蒸馏水清洗接枝 PIPAAm 的培养皿，去除未接枝的 IPAAm，并在氮气中干燥。

(4) 用方形的玻璃盖玻片(24mm×24mm)覆盖接枝 PIPAAm 的表面。

(5) 将 AAm 单体溶于丙醇中，形成 AAm 溶液。

(6) 用丙烯酰胺溶液覆盖步骤(4)培养皿的表面，并用电子束进行照射、清洗。

(7) 在培养皿用盖玻片覆盖处形成方形的 PIPAAm 接枝区域，细胞贴附区域；而其周围为聚 AAm 区域，细胞不贴附。

(8) 使用前用环氧乙烷气体消毒灭菌。

9.5.4 工程化心肌组织的构建

目前，构建工程化心肌组织主要有三种方法，一种是采用预制生物材料支架，细胞在支架的孔中或纤维上生长，从整体上来看形成三维的细胞/支架材料复合体(Li et al. 2000)。第二种是采用液态胶原作为支架，细胞与液态胶原混合成细胞/支架复合物后，铸膜成所需形状，再进行培养形成组织样结构(Zimmermann et al. 2002)。第三种是基于单层细胞片层构建工程化心肌组织的方法，它是借助一种温敏材料，心肌细胞先被接种在这种温敏材料上形成单层的细胞片层，再将这种细胞片层多层叠加，即可形成具有组织样结构的工程化心肌组织(Shimizu et al. 2002)。

9.5.4.1 采用预制生物材料支架构建工程化心肌组织的方法

1) 材料和试剂

(1) 支架材料、多孔海绵状或纤维状(按照预先成型的支架材料的准备方法进行准备)；

(2) 心肌细胞悬液；

(3) 吸管、纱布、培养皿、6孔培养板；

(4) 培养液。

2) 步骤

(1) 心肌细胞调成一定浓度的细胞悬液。

(2) 细胞接种前一天，支架材料用培养液浸泡24h。

(3) 取出支架材料，置于无菌纱布上，以吸去纱布中大部分培养液。

(4) 用吸管吸取细胞悬液滴加在材料上，培养液连同细胞一起被吸入支架材料中。

(5) 将细胞/支架复合体置于6孔培养板孔中，3h后加入培养液进行培养。

(6) 根据培养液颜色变化更换培养基。

(7) 经过2~3天培养可观察到心肌细胞在支架材料上节律性的搏动。

9.5.4.2 基于液态胶原为支架构建工程化心肌组织的方法

1) 材料和试剂

(1) 液态胶原；

(2) 心肌细胞悬液；

(3) DMEM生长培养基；

(4) 0.1mol/L的NaOH；

(5) 精密试纸、吸管；

(6) 胶原铸模装置。

2) 步骤

(1) 液态胶原与2×DMEM等比例混合，用吸管吹打均匀。

(2) 用0.1mol/L的NaOH将混合物pH调为7.0~7.4。

(3) 在上述混合液中添加促心肌细胞生长发育物质。

(4) 细胞悬液与步骤(3)混合物充分混合，形成的细胞/胶原混合液加入铸模槽中铸成所需形状。

(5) 40min 后加入生长培养基进行培养，隔天更换培养液。

(6) 经过 5~8 天的培养可观察到一致跳动的工程化心肌组织的形成。

9.5.4.3 基于细胞片层叠加构建工程化心肌组织的方法

1) 材料和试剂

种子细胞、温敏材料、生长培养基、培养皿、吸管。

2) 步骤

(1) 新生大鼠心肌细胞接种在温敏细胞培养表面，置于 37℃、5%CO_2 孵箱中培养4天。

(2) 将培养皿置于 20℃ 的 CO_2 孵箱中孵育 1h，心肌细胞成片层脱落，漂浮在培养基中。

(3) 立即将整个细胞片层，连同培养基一起吸入 10ml 的吸管的尖部，移到另一个培养皿的表面。

(4) 在细胞片层中部滴加培养基，以使折叠的部分摊开。

(5) 轻轻吸去培养基，使得细胞片层贴到培养皿的表面。30min 后，重新加入培养基，这时细胞片层已贴壁。

(6) 将另一个细胞片层以同样的方法转移到第一个细胞片层上方，定好位置以使两细胞片层充分重叠。缓慢吸去培养基以使两细胞片层相接触。30min 后再次加入培养基。

(7) 重复步骤(6)，将细胞片层叠加，构建工程化的心肌组织。

9.5.5 生物反应器培养

体外培养时，培养环境对工程化组织的形成至关重要。人们设计出各种类型的生物反应器，用来模拟心肌细胞在生理条件下的生长环境，以期获得与正常心肌组织类似的工程化的心肌组织。在正常生理条件下，细胞间是相互联系的。通常的二维细胞培养方法因重力的影响导致细胞联系失常而使组织和器官不能正常生长，只能得到平的、极薄的培养产物。美国宇航局设计的旋转式生物反应器细胞培养系统(RCCS)模拟细胞的微重力环境，可以使细胞在接近正常的方式进行三维生长。该生物反应器还具有低流体剪切力的优点使得细胞易于聚集形成细胞连接，从而有利于三维组织的形成(Rebecca et al. 1999)。

目前，构建的工程化心肌组织的厚度在 4~7 层细胞，当细胞的层数增加时，内部的细胞因缺乏氧气和养料而死亡。为提高构建工程化心肌组织的厚度，近年来人们设计出灌注式组织培养生物反应器，这种生物反应器可使培养液从心肌细胞/支架材料复合体的内部流过，保证了复合体内部的细胞也可获得充足的氧气和养料供应，提高工程化心肌组织的厚度。

下面的方法以旋转式生物反应器细胞培养系统为例，描述使用生物反应器进行组织培养的一般方法。

步骤

(1) 拆开生物反应器，用无菌的去离子水彻底清洗。

(2) 对生物反应器进行灭菌。可用环氧乙烷气体，或70%乙醇消毒。

(3) 用前再次用无菌、去离子水清洗生物反应器。检查接口处以及硅胶气体交换膜是否漏液。

(4) 利用可能的入口点将支持材料、细胞悬液和培养基装入生物反应器。去除可能存在的气泡。接种密度依赖需要的结果。

(5) 将生物反应器接到旋转平台上。

(6) 调整生物反应器的转速，使得支持材料和细胞保持静态悬浮状态。

(7) 把生物反应器放进37℃、95%~100%湿度的CO_2孵箱中。

(8) 24h更换培养基，移去未贴壁细胞。

(9) 以后间隔48h要完全更换培养基。

(赵云山　管利东)

9.6 干细胞与血管组织工程

血管组织工程是应用生命科学和工程学的原理和方法，以分子生物学、细胞生物学、生物工程学和临床医学为基础，设计、构造、改良、培育或保养活组织，用以修复或重建血管的结构并维持或改善其功能的一门新兴的边缘科学。构建的具体策略是将体外获得的或经培养获得的高浓度的、功能相关的种子细胞种植于天然或人工合成的管形细胞外基质上，经过一段时间体内或体外的培养，再将它们移植到体内，以得到新的有功能的血管。自1952年Voorthees开发的第一种人造血管移植物以来，人们对血管替代物的探索从未间断过，血管损伤、缺血性疾病以及动脉瘤等疾病，都需要合适的血管替代物。一个完美的血管替代物应该具有抗感染能力，良好的生物相容性、稳定性、密闭性和抗血栓能力，具有愈合及产生血管的多孔性，具有适当的机械性能，具有一定的血管生理功能，包括对神经和化学物质刺激的收缩舒张功能，以及能够短时间廉价生产出不同种类和足够数量的产品以满足商业需求。临床上已应用的自体血管、异体血管和人工合成材料血管，它们虽然都在一定程度上起到了一些作用，但它们都有各自致命的缺点，距离理想的替代物还有很大的距离。

临床应用的自体血管大多采用乳内动脉和隐静脉，它们不仅来源有限，供区牺牲较大，而且在高压力下易形成血栓、内膜增生、动脉硬化症等；异体血管由于排斥反应、内皮细胞脱落与白细胞反应及血管活性的丧失等原因也已不在外科中应用；人工合成材料血管涤纶Dacron和膨化聚四氟乙烯(ePTEF)，虽然对高流量、低阻力的血管替代效果尚可，然而其在小血管的替代中易于形成血栓，滋生细菌，所以不适宜小口径血管的替代。

目前利用组织工程学方法构建良好血管替代物的血管组织工程学，因近来血管组织工程的三大要素：种子细胞、支架材料及共培养构建研究的不断深入而使得提供一种完美的组织工程化血管成为可能。

9.6.1 种子细胞的分离、纯化、培养及诱导分化

人们曾经设想用自体血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞分层依次构建组织工程血管的内膜、中膜和外膜。Weinberg 等在 1986 年就以上述三种细胞为种子细胞，首先在体外构建出组织工程化血管。然而，此类种子细胞可能存在的不健康，或功能不完善及易于衰老的缺点限制了其应用。干细胞是能够自我复制，尚未分化而且具有可分化为其他多谱系细胞潜能的细胞，是血管组织工程首选的种子细胞。按照发生学来源，干细胞可分为胚胎干细胞和成体干细胞。

9.6.1.1 胚胎干细胞

胚胎干细胞是指由胚胎内细胞团或原始生殖细胞经体外抑制培养而筛选出的细胞。它具有发育全能性，在理论上可以诱导分化为机体中所有种类的细胞。Lenvenberg 等在 2002 年将人的胚胎干细胞成功地诱导出内皮细胞，为组织工程解决内皮化问题提供了新思路。胚胎干细胞的分离、纯化及培养的步骤详见上篇。胚胎干细胞体外向血管内皮细胞的分化步骤如下(Shen et al. 2003)。

(1) 条件培养液：在含 1×10~9×10mol/L 维甲酸的糖 DMEM 中加入 450mg/L 的葡萄糖、20% FCS、0.1mol/L α-巯基乙醇、1000U/ml 白血病抑制因子和 1% 非必需氨基酸。

(2) 将胚体在条件培养液中培养 5 天。

(3) 用 0.1%的凝胶铺在 6 孔板内。

(4) 将胚体接种于 6 孔板内并用含 15% FCS 和 3ng/m 转移生长因子的 DMEM 液继续培养 2~10 天。

9.6.1.2 成体干细胞

成体干细胞是指存在于一种已分化组织中的未分化细胞，这种细胞能够自我更新并且能够特化形成组成该类型组织的细胞。因其来源及分化方向不同可分为造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞、肝脏干细胞、胰腺干细胞、皮肤表皮干细胞、内皮祖细胞等，其中可能作为血管组织工程种子细胞的有内皮祖细胞和间充质干细胞。

1) *内皮祖细胞*

内皮祖细胞是内皮细胞的前体细胞，在胚胎期，内皮细胞系与造血细胞系来源于血岛内共同的祖先细胞；出生后，内皮细胞存在于骨髓，并可被转移至外周血，参与缺血组织的血管重建和血管的内膜化。内皮祖细胞的分离、纯化、培养及分化的步骤详见上篇。

2) *间充质干细胞*

间充质干细胞获取方便，对供体健康无害，不存在免疫排斥及组织配型的问题，又有包括向血管内皮细胞与平滑肌细胞分化的多向分化潜能，它是成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成肌肉细胞和骨髓基质细胞的干细胞，存在于人体很多部位，但以骨髓最多。骨髓来源的间充质干细胞的分离、纯化、培养步骤详见上篇。骨髓间充质干细胞向内皮细胞的诱导分化步骤如下。

(1) 条件培养液：在含 2%胎牛血清的低糖 DMEM 中加入 10ng/ml VEGF、2ng/ml bFGF、1×ITS、尼克酰胺 0.61g/L、地塞米松 0.1μmol/L、牛血清白蛋白(BSA)2g/L、鸟氨酸 0.1g/L、脯氨酸 0.03g/L、谷氨酰胺 0.73g/L、葡萄糖 1g/L、半乳糖 2g/L 及适量微量元素(氯化锌、硫酸锌和氯化锰)等。

(2) 按 1∶3 比例稀释 Matrigel。

(3) 在 96 孔板内，每孔加 15μl 稀释好的 Matrigel。

(4) 条件培养液重悬 P_2~P_6 代骨髓间充质干细胞。

(5) 以 2×10^4 个/cm^2 的细胞密度接种于 96 孔板中。

注意：条件培养液也可只含 2%胎牛血清和 50ng/ml VEGF。

9.6.2 支架材料的选择及处理

可作为血管支架的材料分为不可降解材料、可降解的高分子合成材料和天然生物材料。由于不可降解材料难以进行血管塑形，没有正常的血管生理反应，而且易感染，所以非降解材料已逐渐被淘汰。而且，由非降解材料所构建的血管严格来讲，也不是真正意义的组织工程血管。近年来，将可降解高分子合成材料与天然生物材料结合是大势所趋，它们各有特点，又各有不足：通过二者结合，天然生物材料弥补了高分子合成材料种子细胞黏附不高的缺点，而高分子合成材料又弥补了天然生物材料的力学强度较弱的不足。下面就二者结合举例如下，以说明通常血管支架的处理。

(1) 将含有少量硫酸钡的厚度约 200μm 的聚氨酯管形支架浸没于体积比为 1∶1 的乙醇水溶液中 2~3h 以除去油垢。

(2) 用大量的去离子水冲洗并干燥。

(3) 用止血钳将管形支架的两端夹紧，然后将 1,6-己烷溶液以 0.06g/ml 的剂量注入支架中并于 37℃孵育 10min。

(4) 用大量水漂洗支架并放置 30℃干燥直至重量恒定。

(5) 在管腔中注入重量百分比为 1.0%的戊二醛室温 3h 后用大量去离子水冲洗。

(6) 用 2mg/ml 的凝胶 PBS 溶液 2~4℃孵育 24h，然后用去离子水冲洗。

注意：因支架材料不同，处理稍有不同(Zhu et al. 2004)。

9.6.3 细胞的接种以及与材料的共培养构建

细胞与材料的接种及共培养包括静态接种培养和动态接种培养，静态接种培养即细胞与材料在静止状态、无特殊压力和环境变化的条件下所进行的接种及培养；动态培养包括在生物体内的培养和体外模拟生物体内反应即生物反应器内的种植及培养。血管生物反应器是应用剪切力和张力等力学因素，模拟人体血管搏动和血管冲刷作用，为体外构建组织工程化血管提供适宜的环境的装置，逐渐成为体外构建组织工程血管不可缺少的工具之一。

9.6.3.1 静态接种及培养

(1) 将 1×10^6 个/ml 的种子细胞悬液注入管形支架内腔；

(2) 1h 后移除管腔内液体，翻转支架再重复(1)步骤；

(3) 将支架浸入体积分数为 20%的 FCS 和 80%、1640 培养基中并放置于含 37℃、5% CO_2 孵箱中培养。

9.6.3.2 动态接种及培养(Opitz et al. 2004)

(1) 将含有 1×10^7 个种子细胞的 80ml 培养基和处理后的支架材料放置于滚筒搅拌器的玻璃管中于 37℃过夜。

(2) 连续 4 天重复步骤(1)。

(3) 将接种好的支架放入生物反应器中，频率设为 1Hz，压力由 15/10mmHg 开始隔天增加最后使压力固定于 60/40mmHg，流量为 31/min，低氧状态。

注意：组织工程血管大小不一，因此压力及流量有待进一步探索，并不固定。

9.6.4 组织工程血管的功能评价

组织工程血管的功能评价包括血管组织学、生物学、生物相容性、机械性能以及药理学反应等，现就以下常用的三方面做一简要介绍。

9.6.4.1 血管组织学

组织学染色显示出血管的三层结构：内膜、中膜、外膜。血管内皮细胞能摄取乙酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)，分泌 von Willebrand 因子，中膜平滑肌标志物α-平滑肌肌动蛋白和连接蛋白以及外膜的弹性纤维和胶原纤维染色均应该阳性。

9.6.4.2 生物学

通过检测内皮细胞能否摄取乙酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)和产生 von Willebrand 因子，测定弹性蛋白和胶原蛋白的合成速率、支架材料的降解速率，以及通过对血管平滑肌细胞进行免疫氧化酶染色来检测平滑肌细胞是否表达钙连接蛋白和肌球蛋白重链，都反应出血管是否具有生物学活性。

9.6.4.3 机械性能

合适的机械强度是组织工程血管实现功能的必要条件，而组织工程血管的机械特性主要取决于平滑肌细胞及其产生的细胞外基质胶原蛋白和弹性蛋白的含量。组织工程血管的缝合张力可以采用通用拉伸检测仪检测，组织工程血管的爆破力可用 Chue 等(2004)的方法：

(1) 检测的血管连于三通管的一端，另两端分别为压力转换器(与电脑相连)和空气压缩即压力产生装置。

(2) 在三通管中充满亚甲基蓝等渗盐水后浸没于不含亚甲基蓝的等渗盐水烧杯中。

(3) 加大压力直至亚甲基蓝溶液通过血管壁漏入烧杯中。

9.6.5 问题及展望

以上是对干细胞与血管组织工程的研究进展及实验技术做的简要介绍，由此可以看出血管组织工程的研究和应用仍处于实验探索阶段，还有许许多多的问题需要解决：如何提高支架材料的性质使其易于种子细胞的黏附和增殖；如何短期内获得大量干细胞；如何定向诱导干细胞分化；如何体外模拟人体内环境的生物反应器即仿生条件的选择以及细胞与支架材料相互作用的深层次研究，建立完善的组织工程血管的人体检测技术和评价标准等都需要多学科共同努力，深入研究。

(岳慧敏 裴雪涛)

9.7 干细胞与肝组织工程

目前，常位肝移植是肝功能衰竭及先天性肝代谢疾病唯一成熟的治疗方法。尽管劈离式、活体劈离式等各种肝移植术式最大限度地利用供肝，但因其具有操作复杂、供体缺乏及患者常需终生免疫抑制的缺点，临床应用受到极大的限制。因此，近来，肝组织工程日益成为终末期肝病治疗研究热点，并取得显著进展。

9.7.1 肝组织工程种子细胞

肝组织工程的首要问题是寻找来源充足并有稳定的肝特异性功能的种子细胞。成熟肝脏细胞具有诸多不足而不能成为满意的细胞来源，例如，从肝功能衰竭获取肝脏细胞难度较大、异基因肝脏细胞可能产生免疫排斥反应、体外培养易失去活性与功能等。在过去 30 年中，研究者们发现肝干/祖细胞不但存在于原前肠胚层而且来源于囊胚内细胞群；既可自胎儿、新生儿、成体肝脏分离出，也可存在于肝外组织胰腺和成体骨髓。目前，肝组织工程种子细胞来源的研究主要集中于胚胎干细胞(ESC)与成体干细胞(ASC)上，二者虽各有优点，但 ES 的应用仍有伦理、道德、法律方面的争议；目前 ESC 向肝脏细胞系分化的报道局限于鼠体外研究，且研究显示 ESC 再生能力弱于成熟肝脏细胞 (Katherine et al. 2004)，因此新近有重大研究进展的 ASC 就备受关注。下面仅就骨髓来源与肝脏来源的肝干/祖细胞向肝脏细胞诱导的实验方法做一简介。

9.7.1.1 骨髓造血干细胞

1) $CD34^+$ 骨髓造血细胞的分离、培养与鉴定

(1) 免疫磁珠阳性分离方法(magnetic cell sorting，MACS)略。

(2) 荧光激活细胞筛选(FACS)略。

(3) $CD34^+$ 骨髓造血细胞的鉴定略。

2) CD34$^+$骨髓造血细胞向肝脏细胞的诱导分化(Suzuki et al. 2002)

(1) 培养基的配制：500ml 肝脏细胞培养基(Williams medium E)，加入 50mg/L *L*-谷氨酰胺，100IU/L 青/链霉素，20mmol/L HEPES，20mmol/L 丙酮酸钠，20nmol/L 地塞米松，10ng/ml 表皮生长因子(EGF)，5ng/ml 肝脏细胞生长因子(HGF)，20mU/ml 胰岛素，10%胎牛血清，10%马血清。

(2) CD34$^+$骨髓造血细胞，以 2×10^6 个/ml 的浓度加入到预先铺有 I 型胶原的 96 孔板中。加入培养基。

(3) 隔日换液。

9.7.1.2 骨髓间充质干细胞

以笔者实验室进行的间充质干细胞研究为例简述如下。

1) 骨髓间充质干细胞的分离、培养与鉴定

(1) 无菌条件下采集非血液系统疾病的胸外科手术患者的肋骨或动物的四肢骨，钳夹挤压将骨髓挤出，加适量 DMEM 培养液稀释 200 目筛网过滤，离心去脂肪层，加 DMEM 培养液制成细胞悬液，用密度 1.073g/ml 的 Percoll 分离液分离(1000*g*, 20min)，取界面层，用 PBS 离心洗涤(200*g*, 5min)，以 2.0×10^5 个/cm^2 的密度接种于完全培养液(DMEM +10%胎牛血清)中，置于 37℃、5% CO_2 饱和湿度的孵箱内培养 72h 更换培养液，弃掉未贴壁细胞，以后每 2~3 天换液一次。细胞长到 80%融合时用 0.25%的胰酶消化传代，以 8.0×10^3 个/cm^2 的密度接种于传代培养瓶中进行扩增培养。

(2) 用异硫氢酸荧光素(FITC)或藻红素(PE)标记的表面分子 CD34、CD133、CD31、CD11a、CD44、CD71、CD29-PE、CD45、CD90 抗体对原代 MSC 进行流式细胞术鉴定。扩增后的人 MSC 表型为 CD45$^-$、CD31$^-$、CD11a$^-$、CD34$^-$、CD133$^-$、CD71low、CD29$^+$、CD44$^+$、CD90$^+$。大鼠 MSC 强表达 CD90，不表达 CD45 和 CD31，CD44 弱表达。步骤如下：取扩增后的 MSC，去掉培养液，用 1∶1 的 0.1%的胰蛋白酶和 0.01% EDTA 混合液消化，用含 2% BSA 的 PBS 洗涤后制成 900μl 含有 1.5×10^6 个 MSC 的单细胞悬液，分别加入 Eppendorf 管中，设定一管为标准对照，加入 5μl IgG1-PE/FITC 单克隆抗体；其余各管中加入 FITC 和 PE 标记的单克隆抗体。室温孵育 20min，流式细胞仪检测。

2) 骨髓间充质干细胞的诱导分化

(1) 条件培养液为含 2% 胎牛血清的低糖 DMEM 中加入 10ng/ml HGF、2ng/ml bFGF、1ITS、尼克酰胺 0.61g/L、地塞米松 0.1μmol/L、牛血清白蛋白(BSA)2g/L、鸟氨酸 0.1g/L、脯氨酸 0.03g/L、谷氨酰胺 0.73g/L、葡萄糖 1g/L、半乳糖 2g/L 及适量微量元素(氯化锌、硫酸锌和氯化锰)等。

(2) 每孔加 200μl 条件培养液。以条件培养液重悬 P2-P6 代 MSC，按 2×10^4 个/cm^2 接种于预先铺好 Matrigel(1∶3 比例稀释)的 96 孔板内；每 3 天换液一次。

9.7.1.3 人胎肝干细胞

1) 人胎肝干细胞的分离、培养和鉴定(图 9.4)(Tatenoc et al. 2002)

(1) 水囊引产中期(6 月龄)妊娠胎儿(孕妇身体健康，肝功能正常，胎儿处置获得其父母的知情同意)。

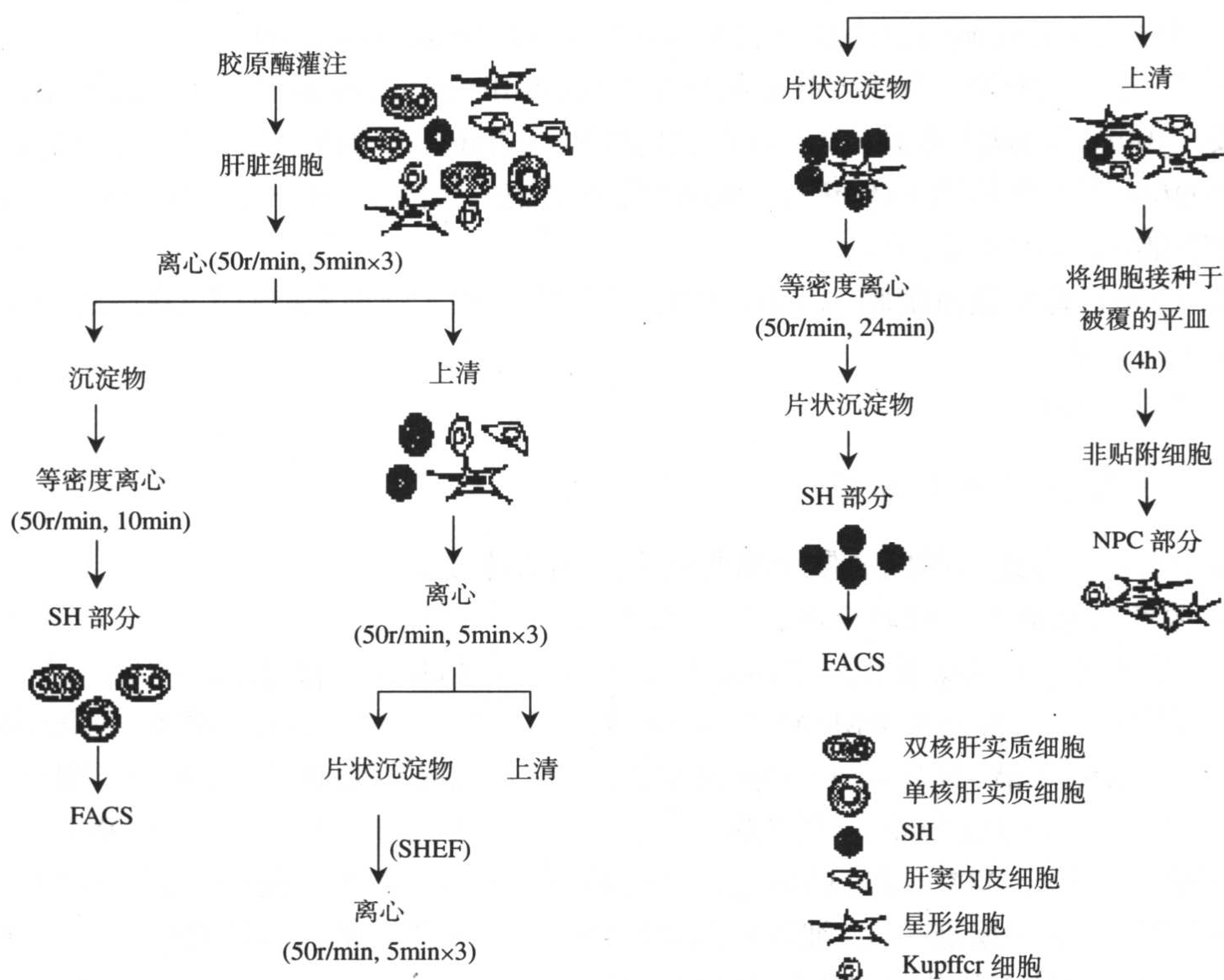


图 9.4　肝实质细胞、小肝脏细胞及非实质制备模式

SH：小肝脏细胞；NPC：非实质细胞；SHEF:富含小肝脏细胞的 NPC 部分；FACS:荧光激活细胞分类法

(2) 自门静脉插管，夹闭肝静脉，0.02% EDTA 灌注 15ml，5min，无钙平衡液(D-Hank)灌注 10ml，5min，胶原酶溶液 (collagenase solution，含 NaCl 8.0g/L、$NaHCO_3$ 0.135g/L、KCl 0.14g/L、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.078g/L，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.151g/L，HEPES 2.38g/L，$CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.74g/L，IV 型胶原酶 1.0g/L)持续灌注 5min，剪开肝静脉/下腔静脉，门静脉-肝脏-腔静脉循环 15min。取下肝脏，剪碎，以 IV 型胶原酶浸泡 2~3h，每 10~15min，振摇一次，促进消化。消化后的肝脏细胞经 200 目网滤过，去除未消化组织，利用 Percoll 储存液配制密度分别为 1.110g/ml、1.070g/ml、1.035g/ml 的 Percoll 使用液，逐层加入内有肝脏脏细胞沉淀的离心管中，4℃条件下 3000r/min 离心 30min；取底层界面细胞，台盼蓝染色测定细胞活力。细胞于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养。细胞传代培养细胞长满一瓶后，用 0.05% 胰酶/EDTA 消化，计数后以 2×10^6 个/ml 的密度接种至新的培养瓶/皿中继续培养。

(3) 原代及传代培养时，应用 AFP、CK18、CK19、Albumin、CD34、LCA 等抗体及 DAKO 公司 LSAB 试剂盒，用 LSAB(链霉亲和生物素、标记)-免疫组织化学(IHC)法进行检测(Adams 1992)。

a. 取人胎肝干细胞进行细胞爬片，细胞爬片用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

b. 4%的多聚甲醛室温固定 15min，PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

c. 用 0.1% Triton(以增加细胞膜的通透性)和 3%过氧化氢(以消除内源性过氧化物

酶的活性)孵育 10min。

d. 正常山羊血清室温下封闭 10min 后，滴加 1：50 稀释的 AFP、CK18、CK19、Albumin、CD34、LCA 等抗体作为一抗，4℃孵育过夜。

e. 滴加生物素化羊抗鼠二抗，37℃反应 45min。

f. 再滴加 SP 复合物，37℃孵育 30min。

g. DAB 显色 5~8min；苏木素复染、脱水、透明、封片。

h. 每次染色均以 PBS 代替一抗作阴性对照，肝脏细胞作为阳性对照，细胞质呈橙黄色视为阳性。细胞微量表达 Albumin、CK18、AFP，不表达 CK19、CD34、LCA 等分子。

2) 人胎肝干细胞的诱导分化

挑选 AFP、CK18、CK19、Vimentin 均表达阳性的细胞克隆，将细胞消化后复悬于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中，内含 10ng/ml 的 EGF，1μmol/L 地塞米松，1μg/ml 胰岛素，10ng/ml HGF，接种于培养瓶中，在 37℃、5%CO_2 培养箱中培养。每 3 天半量换液。

9.7.1.4 诱导分化的肝脏细胞的鉴定

1) 免疫荧光法染色检测

取不同代数 MSC 诱导后 20 天的细胞爬片，进行 CK18、AFP、白蛋白等肝脏细胞标志物/特异蛋白的免疫组化鉴定，第二抗为 FITC 或 TRICE 标记的 IgG，阴性对照用 0.01mmol/L 的 PBS 代替一抗，实验对照用未诱导的 MSC 细胞爬片直接进行免疫组织化学染色。参照中山生物技术公司提供的免疫组化染色方法，操作步骤如下。

(1) 细胞爬片用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

(2) 4%的多聚甲醛室温固定 15min，PBS 洗涤 3 次，每次 5min。

(3) 用 0.1% Triton(以增加细胞膜的通透性)和 3% 过氧化氢(以消除内源性过氧化物酶的活性)孵育 10min。

(4) 蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5min。

(5) 加 20%马血清(1：20)以封闭非特异性结合位点，37℃孵育 15min。

(6) 倾去血清(不洗涤)，分别加 TnI 和 desmin 抗体工作液 50μl，置于湿盒中于 37℃孵育 30min 放 4℃过夜；阴性对照用 0.01mmol/L 的 PBS 代替一抗，实验对照用未诱导的 MSC 细胞爬片直接进行免疫组织化学染色。

(7) PBS 冲洗，5min×3 次。

(8) 滴加荧光标记的二抗(兔抗山羊 IgG-FITC 和抗小鼠 IgG-TRITC)工作液 37℃孵育 30min。

(9) PBS 冲洗 3 次，直接在荧光显微镜下观察实验结果并拍照。

2) 电镜观察

(1) 细胞用培养基洗涤 3 次后，用细胞刮刮去细胞，抽吸细胞悬液，置入玻璃离心管，800r/min 离心 8min。

(2) 前固定：3% 戊二醛(1/15mol/L PBS pH7.4)，4℃下固定 2h。

(3) 漂洗：4℃条件下，1/15mol/L PBS+0.19mol/L 蔗糖缓冲液反复漂洗。

(4) 后固定：4℃条件下，1% 锇酸(0.24mol/L PBS pH7.4)。

(5) 漂洗：4℃条件下，1/15mol/L PBS+0.19mol/L 蔗糖缓冲液漂洗 15min。

(6) 脱水：

a. 50%乙醇　　5~10min；

b. 70%乙醇　　5~10min；

c. 90%乙醇　　5~10min；

d. 90%乙醇+90% 丙酮(1 : 1)　　5~10min；

e. 90%丙酮　　5~10min；

f. 100%乙醇　　10~15min；

g. 以上步骤均在 4℃下进行；

h. 100% 丙酮 10~15min(室温)。

(7) 浸透：100% 丙酮 : 包埋剂(1 : 1)室温浸泡 30min，纯包埋剂浸透过夜。

(8) 包埋：聚合时间为 35℃、12h，45℃、12h，60℃、24h。

(9) 切片：切片机 ULTRACUT E/S 型，超薄切片厚度为 60~70nm。

(10) 染色：醋酸铀染液避光染色 10min，柠檬酸铅染色 10min。

(11) 电镜观察。

3) 肝脏细胞特异因子/蛋白基因的检测

包括：肝脏细胞核生长因子-1α (HNF-1α)、肝脏细胞核生长因子-3β(HNF-3α)、CK18、CK19、清蛋白、AFP、转甲状腺素醛(TTR)与细胞色素 P450-2b1(CYP2b1)基因的检测。

(1) 细胞总 RNA 的提取步骤：

a. 用吸管将培养瓶内(1×10^6 分化的细胞)的诱导培养基吸出弃掉，用 PBS 洗涤 2 次后，加入 TRIZOL(培养瓶底面积每 $20cm^2$ 加 1ml TRIZOL)充分匀浆。

b. 将细胞匀浆全部移入到 1.5ml Eppendorf 管中，室温放置 5min。

c. 加入 0.2ml 氯仿，剧烈振动 15s，并置室温孵育 3min。

d. 4℃、12 000r/min 离心 10min。

e. 仔细将上层水相转移至 1.5ml 的 Ep 管中。

f. 加入 0.5ml 异丙醇，轻轻颠倒混匀，冰上放置 10min。

g. 4℃、12 000r/min 离心 15min，见有白色絮状沉淀沉积在管壁。

h. 弃上清，加入 75% 乙醇 1ml，混匀，充分振荡洗涤，沉淀后 4℃、12 000r/min 离心 5min。

i. 小心弃掉上清，室温放置 15min 干燥沉淀，加入 30μl 无 RNase 的水溶解 RNA 沉淀，定量后放-20℃保存备用。

整个操作过程使用的器械及液体均经 0.1% DEPC 水处理，戴消毒手套操作。

(2) 细胞总 RNA 的鉴定：

a. 浓度分析和纯度鉴定：从所提取的 RNA 中吸取 1μl，稀释至 100μl 后，利用光谱仪分别测定其在 260nm 和 280nm 波长处的吸光度(OD_{260} 和 OD_{280})，通过下述公式计算 RNA 的浓度：

$$\text{RNA}(\mu g/\mu l)=OD_{260}\times40\times100/1000$$

同时，计算 OD_{260} 和 OD_{280} 的比值(OD_{260}/OD_{280})，当两者比值大于 1.8 时，说明提取的 RNA 较纯，无蛋白质和 DNA 的残余。

b. 完整性鉴定：利用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，具体方法如下：配制 1% 琼脂糖变性胶(10×MOPS 缓冲液 10ml/0.1% DEPC 水 90ml/琼脂糖 1.0g)，加热至胶完全溶化后，在室温放置冷却至 60℃，依次加入 6μl EB(10mg/ml)，5.4ml 37%的甲醛，混匀后倒入制胶器制胶。取 RNA 样 5μl，加入 5×MOPS 缓冲液 2μl，37%的甲醛 3.5μl 和甲酰胺 10μl，65℃放置 15min，冰浴冷却，短暂离心后加入 2μl 甲醛凝胶加样缓冲液，加样后以 1×MOPS 缓冲液电泳，紫外灯下观察相应 RNA 的完整性。

(3) RT-PCR：

a. 将所获得的总 RNA 稀释为 1μg/μl，取 4 个 1.5ml 的灭菌 Eppendorf 管，分别加入以下成分：

RNA(1μg/μl)	5.0μl
Oligo(dT)12~18(500μg/ml)	1.0μl
无菌水	12.0μl

b. 将内容物混匀，70℃孵育 10min 后迅速于冰上冷却。

c. 短暂离心后分别向 4 个管内加入：

5×第一链缓冲液	4.0μl
DTT(0.1mol/L)	2.0μl
dNTP 混合物(每种 10mmol/L)	1.0μl

d. 轻微振荡混匀后，置于 42℃孵育 2min。

e. 加入 1μl (200U) SUPERSCRIPT II，混匀，42℃孵育 50min。

f. 70℃孵育 15min 终止反应，合成的 cDNA 用作 PCR 模板。

(4) 分别根据 HNF-1α、HNF-3α、CK18、CK19、清蛋白、AFP、TTR、CYP2b1 基因全长设计 PCR 引物如表 9.1 所示：

表 9.1 基因长度与引物序列(Cai et al. 2004)

基因	引物	片段/bp
HNF-1α	S:5′-AGCTGCTCCTCCATCATCAGA-3′	138
	A:5′-TGTTCCAAGCATTAAGTTTTCTATTCTAA-3′	
HNF-3α	S:5′-CCTACTCGTACATCTCGCTCATCA-3′	68
	A:5′-CGCTCAGCGTCAGCATCTT-3′	
CK18	S:5′-GCCCTGGACTCCAGCAACT-3′	70
	A:5′-ACTTTGCCATCCACGACCTT-3′	
CK19	S:5′-ACCATGCAGAACCTGAACGAT-3′	83
	A:5′-CACCTCCAGCTCGCCATTAG-3′	
清蛋白	S:5′-CTGGGAGTGTGCAGATATCAGAGT-3′	141

续表

基因	引物	片段/bp
	A:5′-GAGAAGGTCACCAAGTGCTGTAGT-3′	
AFP	S:5′-GTCCTTTCTTCCTCCTGGAGAT-3′	145
	A:5′-CTGTCACTGCTGATTTCTCTGG-3′	
TTR	S:5′-CAGCAGTGGTGCTGTAGGAGTA-3′	152
	A:5′-GGGTAGAACTGGACACCAAATC-3′	
CYP2b1	S:5′-ACTTTCCTGGTGCCCACA-3′	157
	A:5′-TCCTTCTCCATGCGCAGA-3′	

(5) PCR 扩增(20μl 体系)：

10×PCR buffer(含 $MgCl_2$)	2.0μl
dNTP(2.5mmol/L)	2.0μl
引物 1(10μmol/L)	1.0μl
引物 2(10μmol/L)	1.0μl
Taq DNA 聚合物	0.5μl
cDNA(模板)	1.0μl
灭菌水	12.5μl
总体积	20.0μl

PCR 反应条件为：94℃变性 5min 后开始扩增循环，循环参数为 94℃、30s，55℃、35s，35 个循环，72℃、7min 后 4℃保存。

用 GAPDH 作标准对照。GAPDH 引物如下：

上游引物：5′-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3′；

下游引物：3′-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-5′。

(6) 琼脂糖凝胶电泳：分别取 PCR 扩增产物 5μl 在 1%的琼脂糖凝胶上进行电泳，电泳缓冲液为 1×TAE。

4) 分化细胞的功能检测

(1) PAS 染色检测糖原。细胞以 95% 乙醇固定 10min，蒸馏水冲洗干净，1% 过碘酸水溶液反应 10min，蒸馏水冲洗，晾干，加 Schiff 试剂 30min，亚硫酸水洗 3 遍，自来水冲洗，晾干，加 2% 甲基绿复染 15min，自来水充分冲洗、常规脱水、透明、中性树胶封片。糖原在胞质内为红色阳性物，呈弥散状、颗粒状或块状。

(2) 尿素检测。在培养液中加入 10mmol/L 的 NH_4Cl 培养 24h，用尿素试剂盒测定产生的尿素的浓度。

(3) 利用 ECOD 活性检测细胞色素 P-450 酶的活性(Pohl et al. 1980)。反应体系中含 100mmol/L 6-磷酸葡萄糖 100μl，6-磷酸葡萄糖脱氢酶 2U，100mmol/L $MgSO_4$ 100μl，40mg/ml 牛血清清蛋白 100μl，0.04mmol/L ERF 100μl，S10 0.5mL，0.1mol/L pH7. 8 Hepes 液 0.25ml，0.4mmol/L NADPH 100μl。反应体系总体积为 1.25ml。反应物于 37℃孵育 30min 后，加 2.5ml 甲醇终止反应。经 3000r/min 离心 10min 去除沉淀蛋白质，上清液用荧光

分光光度计于发射波长 585nm、激发波长 550nm 测定 EROD 反应终产物乙氧基-9-羟基异吩噁唑酮的荧光强度。

(4) 蛋白质合成功能检测(Tong et al. 1992)。将 1μl/ml[3H]-亮氨酸加入培养基中，置于 37℃、5% CO_2 培养 24h。肝脏细胞用 Hank 缓冲液离心洗涤 2 次，然后在细胞滤纸上用体积分数为 10%的三氯醋酸裂解和无水乙醇固定，用液体闪烁仪计数[3H]-亮氨酸的量。

(5) 葡萄糖合成功能。将培养基换成含 160g/L (*m*/*V*)果糖的 Hank-HEPES 液，分别于 1h、4h、8h 取上清在全自动生化仪(MEGA Toshiba)上测定葡萄糖的浓度。

(6) 安定转化功能(Baccarani et al. 2000)。在培养基中加入 20mg/L (*m*/*V*)安定标准品培养 24h(Burchell et al. 1988)，用荧光偏振免疫分析仪(Abbott TDX)测定上清中安定的浓度。

(7) 葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)活性。收集肝脏细胞、粉碎，以葡萄糖-6-磷酸为底物，反应的终产物磷酸的量表示该酶的活性。

(8) 靛青绿(ICG)摄取实验(Yamada et al. 2002)。向培养体系中加入 ICG 37℃孵育 15min 后，只有肝脏细胞能被染成深绿色；换回完全培养基常规培养 4h 之内，着色细胞的颜色完全褪去。

9.7.2 肝脏组织工程支架

组织工程中细胞支架可提供黏附空间，增加表面积，为大数量的细胞提供支持，重要的是支架必须具备生物相容性的特点，允许细胞、组织、器官在支架的表面、空间内生长，并在一段时间内保持稳定，为细胞增殖生长营造适宜的环境，并规定引导细胞的生长方向，起到塑形的作用。同时，它应随着细胞的繁殖而逐渐降解、消失，以利于将空间让位于细胞，并使所生成的组织和器官具有同支架相同的形状。因此作为细胞支架的高分子材料必须具有生物降解性，即在生理或体内环境下组成材料的分子链能自动断裂，由此产生的小分子能逐渐被机体代谢或吸收。此外，还要求材料的降解速度与细胞的增殖速度相匹配，降解产物不会对细胞繁殖产生不利的影响，支架还要有充足的表面积让细胞贴附并能提供细胞克隆扩增的足够空间。因此组织工程的细胞支架材料必须具有生物降解性和一定的降解速度、良好的生物相容性及细胞亲和性。此外，组织工程的细胞支架，不仅应具有在细胞培养过程中能保持形状、不会破碎、可以操作的力学强度外，从临床应用出发，细胞支架还应具有一定的柔韧性，使之能够同机体组织相缝合、并能同机体组织贴合，也不会对机体组织造成机械损伤的力学性能。考虑到血管新生或血管发生，支架的孔径必须是可控的。因此，作为组织工程细胞支架的生物材料必须兼具有生物可降解性、良好的生物相容性、细胞亲和性、一定的力学性能、可加工性，规格的可控性，以及可消毒性等。

组织工程用生物降解材料可分为天然降解材料、合成降解材料和复合材料。天然降解材料如羟基磷灰石、珊瑚礁和磷酸钙、壳聚糖、海藻酸盐、胶原蛋白、葡聚糖、透明质酸、明胶和琼脂等，它们的优点是具有特异性的分子识别功能、生物相容性好，通常更易于细胞附着在其上面；缺点是存在力学强度较差、性能不稳定及因宿主酶环境变化

而降解行为不好调节等。合成降解材料的优点是强度高、来源充足、易于加工，微结构、渗透性、机械性能、形态以及降解时间等都能预先设计和调控，最终的完全降解可以避免异物所引起的不良反应；缺点是因为缺乏细胞外基质中的生物信号和功能基团，与种子细胞的黏附性较差，缺少内在的生物活性、降解产物有毒、可能引起植入部位微环境(如pH)发生变化；此外，在材料降解速度的可控性、强度、可注射性、组织相容性、细胞亲和性、可加工性及可消毒性等方面仍有许多问题有待解决。近年来，将可降解高分子合成材料与天然生物材料结合成为热点，它们各有特点，又各有不足，把两者结合可发挥两者的优势。通过二者结合，天然生物材料弥补了高分子合成材料种子细胞黏附不高的缺点，而高分子合成材料又弥补了天然生物材料的力学强度较弱的不足，从而取长补短，因此成为开发新型组织工程材料的有效途径。

聚乳酸(PLA)是经 FDA 批准的极少数可用于人体的可降解聚合物材料之一。PLA 在人体内代谢的最终产物是 CO_2 和 H_2O，中间产物乳酸也是体内正常糖代谢的产物，不会在重要器官聚集，因此具有优异的生物降解性与可吸收性。

同时，由于聚乳酸细胞亲和性差，疏水性较强，降解速度很慢，在体内长期存在容易引发炎症和肿胀并发症。因此，聚乳酸通常不单独作为组织工程支架材料，而是利用与其他单体的共聚、与其他聚合物共混，或者用天然高分子或天然无机物与聚乳酸共混或杂化的技术，通过控制材料的组分、组成比、分子质量、分子质量分布等手段，达到调节和控制材料性能的目的。现在聚乳酸类材料已有了物理性能由液态到固态、强度由弱到强、硬度由软到硬、生物降解速度(降解半衰期)由几周至几年可供选择(任杰等 2004)。

聚乳酸共聚物是应用的最多的组织工程材料，聚乙醇酸(PGA)降解速度快并亲水性好，聚己内酯(PCL)药物通透性优良，通过单体共聚的方法可以得到聚(乙交酯/丙交酯)共聚物(PLGA)、聚(己内酯/丙交酯)共聚物(PLC)、聚(乙交酯/己内酯) 共聚物(PGC)、聚己内酯/聚丙交酯/聚乙二醇三元共聚物(PCEL)以及聚(乙交酯/丙交酯/己内酯)三元共聚物(PGLC)等一系列聚乳酸共聚物，这些材料广泛用于组织工程(Katherine et al. 2004)。

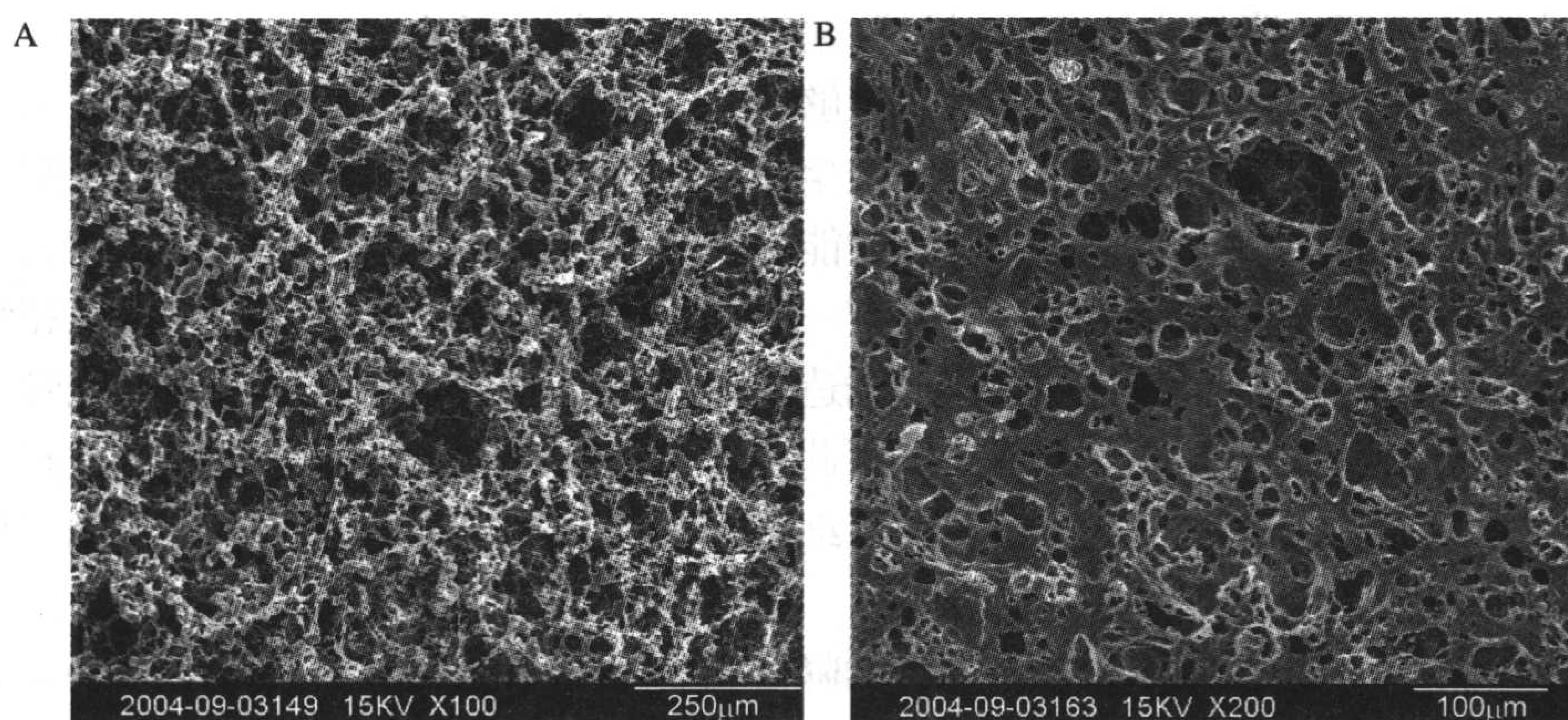


图 9.5　电镜下 PLGA 支架结构

A. 内壁；B. 外壁

笔者实验室与清华大学机械系合作，分别检测了各种孔隙率、不同比例的 PLGA、PLLA 和 Pu(聚氨酯)与 MSC、EC(endothelial cell，内皮细胞)的相容性、贴附率，通过 MTT 检测及扫描电镜观察比较，发现腔壁孔隙率为 90%，孔径范围为 30~50μm，并且分布有体积比为 9：1 的直径 150~200μm 的大孔的 PLGA(图 9.5)更有利于 MSC 生长和增殖及分化，因而确定为我们采用的肝脏、血管组织工程的支架材料之一。

9.7.3 生物反应器

具备了大量可靠的种子细胞和符合要求的生物支架材料，仅仅是完成了组织工程化组织或器官构建的第一步。任何细胞团体积大于 $1mm^3$ 时，如无血管的长入，则会死亡。细胞必须有 200~300μm 血液供应来交换所需的养分与氧气，排出二氧化碳与代谢废物。当细胞团在培养或移植后生长时，细胞团外围的细胞存活而中心的细胞则不能。为了使中心细胞得到足够的血供，细胞需在不断流动的、具备维持正常功能所需的参数的培养基中培养。因此，必须开发出在生物反应器中大量培育细胞或组织器官的更加先进的方法。生物反应器是一个密闭系统，包括一个密闭容器，内有种植有细胞的多聚体支架，循环培养基的管道，一个储存多余培养基的容器，一个消除气泡的气阀和一个培养基进行氧化的肺。通过动力种植技术，细胞种植在多聚体上后，置入生物反应器的密闭容器中，培养基在微孔中流动，替代血管，使三维培养的肝脏细胞在更长的时间内有良好生长环境。种植的细胞在生物反应器中培养可在数周内保持功能。相应的肝脏支持系统(liver assist device，LAD)——生物人工肝脏就是利用肝脏细胞暂时支持患者，直至肝脏移植。其功能就类似生物反应器。但更重要的是生物反应器显示了在未来应用中所需的一些特殊参数。特别是在支架上的任何位置，肝脏细胞必须暴露于连续不断流动条件，说明了血管生成与血管新生的重要性与必要性。

9.7.4 组织构建技术

肝脏组织工程是一个多学科交叉领域，包括生物学、细胞生物学、生物化学、分子生物学、聚合物化学、聚合物物理学与生物医学工程，其最终目标是构建一个完整的、可移植的有功能的肝脏。但肝脏组织器官工程的研究目前还没有成熟的方法，尚处于起步阶段。学者们已进行了很多尝试，如将细胞直接注射入现有的血管床、微载体黏附、细胞种植在支架上等。肝脏作为复杂血管器官，其组织工程所必须克服的一个障碍是为内部细胞供给养分、排出废物。只有在体外成功构建了管道系统——血管网，通过营养液(模拟血液)在管道内的循环为细胞供应营养和氧，或者将人工制造的肝脏组织与宿主血液循环连接起来得到宿主的血液供应，才可能使其细胞成活。肝脏组织工程血管化是构建组织工程肝脏的关键。解决这个问题有两种方法：在细胞团内部出现血管发生(生长成型)或者事先血管化，建立血管床并将细胞种植在血管网周围(制造成型)(吴仕和等 2004)。具体包括以下几方面。

9.7.4.1 生长成型

1) 血管长入多孔海绵支架血管化

用聚乳酸-聚羟基乙酸(poly lactic-co-glycolic acid，PLGA)材料制作多孔化的海绵支架，孔隙率为90%~95%。将小鼠肝脏细胞种植在1mm厚的PLGA海绵支架上，1h后植入腹腔，一周后观察发现，大量毛细血管长入支架中，支架的孔隙率越大，血管长入和肝脏细胞的数量就越多。这一实验证明多孔PLGA海绵支架支持的肝组织移植入体内后能够获得血管化而成活，成活的肝脏细胞和血管的量与孔隙率有密切关系。

2) 肝脏支架释放生长因子诱导血管长入血管化

体外利用可降解多聚高分子材料制造肝支架，然后将细胞生长因子复合到肝支架材料上，细胞生长因子仍保持其活性，肝脏细胞种植在支架上构建成组织工程化肝脏组织，将其植入体内，这些生长因子缓慢地释放，刺激血管长入支架内，形成新生血管。这一实验证明生长因子在肝脏组织工程的体内血管化中起非常重要的作用。下一步仍需要进一步地探讨生长因子最佳释放方式，并有效地控制血管化的行为，即将血管构建在合适的部位，或按照组织结构的需要定向有序地生长，并防止它过度生长。

3) 转染了血管内皮细胞生长因子基因的肝脏细胞表达诱导血管长入血管化

将血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)基因转染到鼠肝脏细胞中，然后用事先由胶原包被过的尼龙膜将转染了VEGF基因的肝脏细胞包裹起来，移植入腹腔紧贴肝脏的部位，包裹的顶端紧贴着肝脏，底部紧贴着肠系膜。3周后剖腹观察，发现尼龙膜被厚厚的一层血管网包裹，组织学检查发现血管穿过尼龙膜伸入到包裹内的肝脏细胞间，形成发育良好的血管网。用RT-PCR检测发现包裹中的肝脏细胞在3周后仍然表达白蛋白，表明穿过包裹的血管为肝脏细胞的成活提供了足够的营养和氧。

9.7.4.2 制造成型

1) 使用三维打印技术制成内含网状管道的PLGA肝支架

用三维打印(3D printing，3DP)技术制造出内含网状相连的管道化PLGA支架，方法为，将黏胶剂喷射到包埋有直径45~150μmol/L氯化钠颗粒的PLGA粉末上，将粉末连接在一起得到二维层片，逐层叠加得到三维实体。然后，将其与环氧乙烷一起加热熏蒸，48h后氯化钠晶体与水蒸气一起挥发掉，形成多管道(约60%)的支架，管道的直径45~150μmol/L。在支架上种植肝脏细胞，然后进行静态培养和流动培养比较，发现流动培养肝支架的氧分压，白蛋白、葡萄糖水平及pH均优于静态培养者。表明流动培养条件下的管道化支架为肝脏细胞的代谢和白蛋白的合成提供了充足的氧和养分。

2) 使用微制造技术制造具有血管网的肝脏组织

利用影印石板技术(photolithography technique)，在硅和耐热玻璃制成的模板上，蚀刻形成具有各级分支的血管和毛细血管的完整的血管网，内皮细胞和肝脏细胞分别种在不同版蚀刻的二维沟渠里，这两种细胞分别在硅和耐热玻璃制成的模板上生长增殖，肝脏细胞仍保持分泌白蛋白的特性。然后将单层的内皮细胞和肝脏细胞分别刮起来，将内皮细胞卷成三维的血管网，用微制作技术(micro-fabrication technology)在血管网外紧贴着一层肝脏细胞，形成了立体的血管化的肝组织，体外培养显示内皮细胞和肝脏细胞的功

能良好，可用于体内植入。

3) 计算机辅助构建具有血管系统的组织工程肝脏

将液体的支架材料注入肝脏的血管系统中，当液体的支架材料凝固后，将肝脏的细胞及结缔组织去掉，仅留下固体的血管系统铸型。测量血管的长度、直径及分支角度，并将数据输入计算机重建肝脏血管树模型。对重建的肝脏血管树模型经计算机程序处理，即将肝脏血管模型在不同的平面切割，获取每一切面的数据。根据这些数据，在计算机控制下制造含有血管系统的生物相容性好的可降解的肝脏支架，然后将内皮细胞种植在肝脏支架的管腔内，肝脏细胞种植在支架上的管腔之间。进而形成了含有血管系统的组织工程肝脏。将其放在体外流动培养，形成活的组织工程肝脏。这种方法目前正在研究中。

9.7.4.3 生长成型与制造成型相结合的肝脏组织工程技术

笔者实验室将 DAPI 标记的人的 MSC 悬浮于纤维蛋白凝胶中，种植于内表面覆盖有 Matrigel 并有微血管通道的 PLGA 分叉管形支架材料上；将人胎肝细胞悬浮于纤维蛋白凝胶中，种植于分叉管外包装的锥形支架材料上，将其放置于肝损伤后的 NOD-SCID 裸鼠腹腔中(或腹膜外或包裹于大网膜中)，4 周后取出，行冰冻组织切片和石蜡切片，并行免疫组化检测发现，DAPI 标记的 MSC 来源细胞通过通道穿出支架，参与支架外壁形成血管结构；并长入肝脏细胞团中形成肝血窦样结构，vWF、flt-1、flk-1、CD31 阳性；肝脏细胞分泌白蛋白，具备活性。具体步骤如下。

1) 清华大学机械工程系负责的基于溶芯技术的管网支架成型方法

(1) 首先根据需要制作支架的内流道或者内腔形状用三维 CAD 软件设计内芯三维 CAD 模型(图 9.6)。

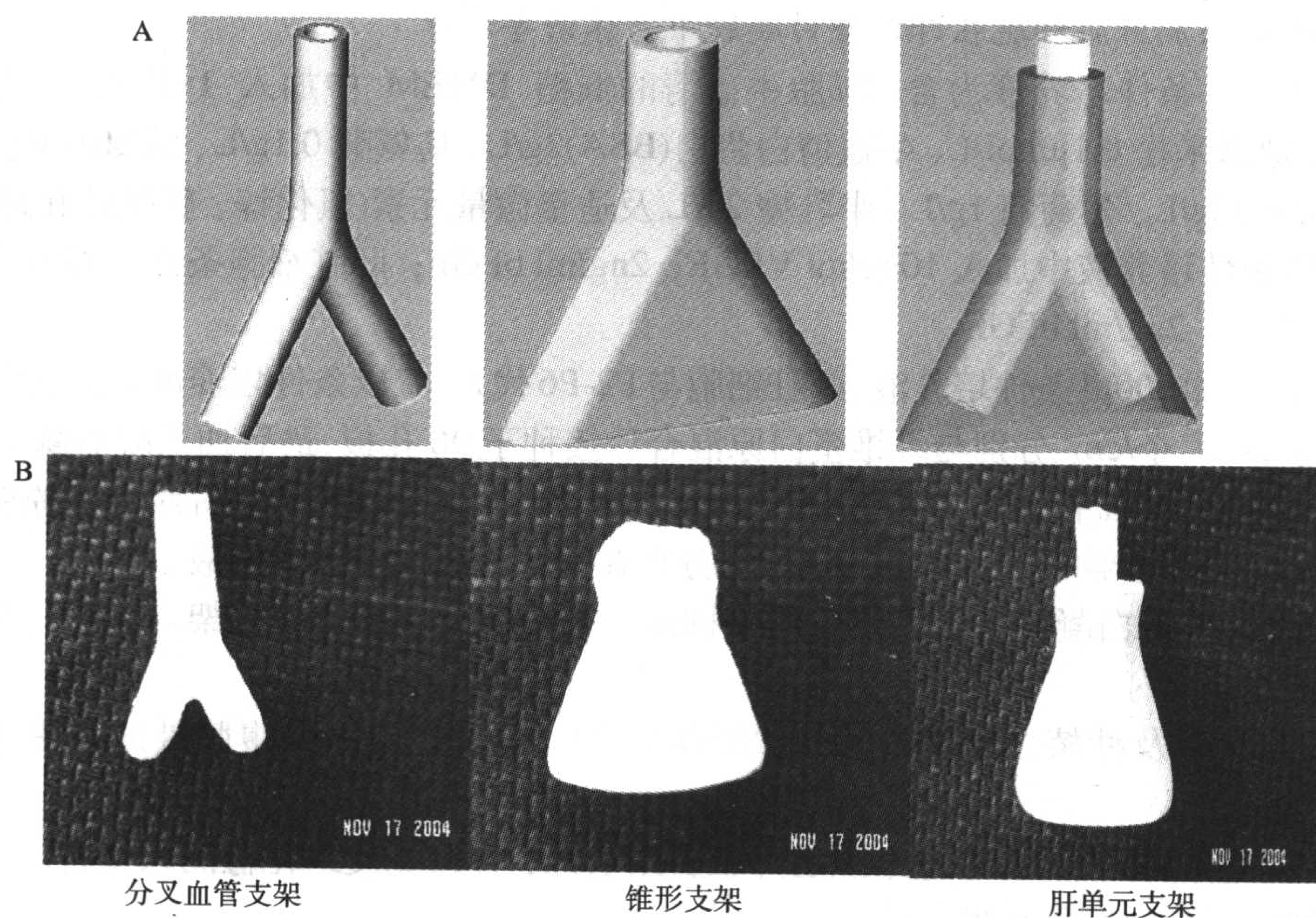


图 9.6 PLGA 支架

A. 设计图；B. 成品

(2) 采用熔融挤出制造工艺制作内芯。内芯使用的材料为无毒、易溶于水的麦芽糖基混合物。

(3) 将可降解 PLGA 支架材料，配制成溶液，加入一定比例的致孔剂(特定粒度范围的 NaCl 颗粒)，并均匀混合。

(4) 在内芯表面上均匀涂敷一定厚度的 PLGA 溶液。

(5) 自然风干后，放入蒸馏水中，溶除内芯以及致孔剂。

(6) 干燥后即可得到支架。

2) 丙烯醇(AA)致 NOD-SCID 裸鼠肝脏损伤模型的制备和损伤鉴定

(1) NOD-SCID 裸鼠，6~8 周，体重 20~30g。

(2) 经腹膜内注射 AA 0.21mmol/kg 建立急性肝衰竭大鼠模型。

(3) 不同时间活杀小鼠，取肝脏组织经福尔马林固定后制成 6μm 厚的石蜡切片。

(4) 组织切片 HE 染色。

a. 石蜡切片入二甲苯脱蜡及乙醇梯度脱水。

b. 苏木素溶液染色 8~10min，流水洗 1min。

c. 10g/L 盐酸乙醇分化 10s，水洗 30min。

d. 伊红染色 3~5min，水洗。

e. 常规乙醇梯度脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

3) MSC 与胎肝细胞的 DAPI 标记

将无菌的 DAPI 储存液加入培养的 MSC 或胎肝脏细胞上清中，至终浓度为 50mg/L，37℃孵育染色至少 30min。细胞至少用 Hank 平衡盐溶液冲洗 6 遍以除去未结合的 DAPI。离心收集细胞，用无血清的 DMEM 悬浮至移植所需浓度，置于冰上至少 1h 备用。

4) MSC 与胎肝脏细胞在纤维蛋白凝胶中立体诱导培养

(1) MSC 条件培养液为含 2%胎牛血清的低糖 DMEM 中加入 1×ITS、尼克酰胺 0.61g/L、地塞米松 0.1μmol/L、牛血清白蛋白(BSA)2g/L、鸟氨酸 0.1g/L、脯氨酸 0.03g/L、谷氨酰胺 0.73g/L、葡萄糖 1g/L、半乳糖 2g/L 及适量微量元素(氯化锌、硫酸锌和氯化锰)等。MSC 条件培养液中加入 10ng/ml VEGF、2ng/ml bFGF；肝脏细胞条件培养液中加入 10ng/ml HGF、2ng/ml bFGF。

(2) 每孔加 200μl 条件培养液。肝脏细胞与 P2-P6 代 MSC 以条件培养液重悬，按 6×10^4 个/cm^2 与 2×10^4 个/cm^2 分别与纤维蛋白原混合后接种于 96 孔板，最后加入凝血酶 2U/孔，混合液体积为 100μl/孔，纤维蛋白原终浓度为 2mg/ml。加入凝血酶后纤维蛋白原变成纤维蛋白，呈半透明半固体凝胶，细胞均匀分布在立体凝胶中。隔天换液。

(3) 将纤维蛋白凝胶自细胞培养板中挑出，分别放入血管分叉支架与血管分叉管外包装的锥形支架内。

(4) 将支架及种植之细胞种植于 NOD-SCID 裸鼠腹腔中(或腹膜外或包裹于大网膜中)。

(5) 4 周后，取出，行冰冻组织切片和石蜡切片；并行免疫组化检测人血管内皮细胞与胎肝细胞特异性标志与蛋白质。

(6) 定期取眼血，Western 印迹检测人白蛋白。

(7) 肝脏组织工程作为一个多学科交叉领域，正方兴未艾，在未来的发展中，组织

工程学与临床、基础科学的紧密协作与共同研究是至关重要的。组织工程的每一步进展，都向着实现可移植肝脏前进了一步。即使制造出一个完整的可移植肝脏的目标暂时没有实现，相关领域，最主要的是患者都将自这过程中的每一个进展当中获益。

(梁　峰　王榅芳　南　雪)

主要参考文献

鄂征，刘流. 2003. 医学组织工程技术与临床应用. 北京：北京出版社. 111, 334, 380

司徒镇强. 2004. 细胞培养. 第二版. 西安：世界图书出版西安公司. 149, 265

蔚凡，杨志明，彭文珍. 1995. 人胚腱细胞体处培养及生物特性研究. 中国修复重建外科杂志, 9(3): 161~164

吴仕和，徐迎新，李荣. 2004. 肝组织器官工程血管化的研究进展. 中华实验外科杂志, 117~118

项舟，杨志明，蔚凡等. 2000. 组织工程人工肌腱的实验研究. 中华手外科杂志, 16(3): 140~143

杨志明. 2004. 组织工程基础与临床. 成都：四川科学技术出版社. 164, 205, 212

杨志明等. 2002. 现代生物技术丛书——组织工程. 北京：化学工业出版社. 74, 219

张前法. 杨志明. 彭文珍. 1997. 兔肌腱细胞与成纤维细胞生物学特性研究. 中国修复重建外科杂志, 11(1): 46~48

Adams JC. 1992. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. J Histochem Cytochem, 40(10): 1457~1463

Awad HA, Butler DL, Boivin GP et al. 1999. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. Tissue Eng, 5(3): 267~277

Baccarani U, Donini A, Risaliti A et al. 2000. Steatotic versus cirrhotic livers as a sorce for human hepatocyte isolation. Transpl Proc, 33: 664~665

Bahrami S, Stratmann U, Wiesmann HP et al. 2000. Periosteally derived osteoblast-like cells differentiate into chondrocytes in suspension culture in agarose. Anat Rec, 259(2): 124~130

Benya PD, Shaffer JD. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell, 30(1): 215~224

Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L et al. 1994. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Exp Cell Res, 212(1): 97~104

Boyce ST. 1999. Methods for the serum-free culture of keratinocytes and transplantation of Collagen-GAG-Based skin substitutes. *In*: Morgan JR, ed. Tissue Engineering Method and Protocols. New jercey: Humana Press. 365~390

Burchell A, Hume R, Burchell B. 1988. A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. Chin Chim Acta, 173: 183~219

Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ et al. 1992. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. J Orthop Res, 10(6): 745~758

Cai YF, Zhen ZJ. 2004. Selection, proliferation and differentiation of bone marrow-derived liver stem cells with a culture system containing cholestatic serum *in vitro*. World J Gastroenterol, 10(22): 3308~3312

Caterson EJ, Nesti LJ, Danielson KG et al. 2002. Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. Mol Biotechnol, 20(3): 245~256

Chue WL, Campbell GR, Caplice N et al. 2004.The dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous artificial blood vessels. J Vasc Surg, 39(4): 859~867

Claire L. 1996. Establishment and Maintenance of Normal Human Keratinocyte Cultures. In: Jones GE, ed. Human Cell Culture Protocols, 1st. New jercey: Humana Press. 1~8

Derick CM, Anil T, Karen MH. 2004. Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features.Biomaterials, 25: 53~61

Freed LE, Hollander AP, Martin I et al. 1998. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. Exp Cell Res, 240(1): 58~65

Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Langer R. 1993. Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. J Cell Biochem, 51(3): 257~264

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI et al. 1968. Heterotopic of bone marrow.Analysis of precursor cells for osteogenic

hematopoietic tissues.Transplantation, 6(2): 230~247

Hsu MY, Herlyn M. 1996. Cultivation of normal human epidermal melanocytes. *In*: Jones GE. Human Cell Culture Protocols. New jercey: Humana Press. 9~20

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI et al. 1998. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res, 238(1): 265~272

Kim HJ, Kim UJ, Vunjak-Novakovic G et al. 2005. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. Biomaterials, 26(21): 4442~4452

Koch K S, Leffert H L. 2004. Normal liver progenitor cells in culture. Stem Cells Handbook, 367~384

Kulig K M, Vacant J P et al. 2004. Hepatic tissue engineering. Transplant Immunology, 12: 303~310

Kulyk WM, Hoffman LM. 1996. Ethanol exposure stimulates cartilage differentiation by embryonic limb mesenchyme cells. Exp Cell Res, 223(2): 290~300

Langer R, Vacanti JP. 1993. Tissue engineering. Science, 260(5110): 920~926

Lee HS, Huang GT, Chiang H et al. 2003. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis.Stem Cells, 21(2): 190~199

Li RK, Yau TM. 2000. Construction of a bioengineered cardiac graft. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 119(2): 368~375

Lieb E, Milz S, Vogel T et al. 2004. Effects of transforming growth factor beta1 on bonelike tissue formation in three-dimensional cell culture. I: Culture conditions and tissue formation.Tissue Eng, 10(9~10): 1399~1413

Lieb E, Vogel T, Milz S et al. 2004. Effects of transforming growth factor beta1 on bonelike tissue formation in three-dimensional cell culture. II: Osteoblastic differentiation.Tissue Eng, 10(9~10): 1414~1425

Lin KH, Maeda S, Saito T. 1995. Long-term maintenance of liver-specific functions in the three-dimensional culture of adult rat hepatocytes with a porous gelatin sponge support. Biotechnol Appl Biochem, 21: 19~27

Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA et al. 1995. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors.J Clin Invest, 95(2): 881~887

Medalie DA, Morgan JR. 1999. Preparation and transplantation of a composite graft of epidermal keratinocytes on acellular dermis. *In*: Morgan JR. Tissue engineering method and protocols. New jercey: Humana Press. 407~421

Opitz F, Schenke-Layland K, Richter W et al. 2004. Tissue engineering of ovine aortic blood vessel substitutes using applied shear stress and enzymatically derived vascular smooth muscle cells. Ann of Biomed Eng, 32(2): 212~222

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.Science, 284(5411): 143~147

Poh I RJ, Fouts JR. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. Anal Biochem, 107 (1): 150~154

Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, et al. 2000. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. J Biomed Mater Res, 52(2): 246~255

Rebecca LC, Maria P et al. 1999. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. Biotechno Bioeng, 64(5): 580~589.

Shen G, Tsung HC, Wu CF et al. 2003. Tissue engineering of blood vessels with endothelial cells differentiated from mouse embryonic stem cells. Cell Research, 13(5): 335~347

Shimizu T, Yamato M, Isoi Y et al. 2002. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. Circ Res, 90, e40: 1~9

Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T et al. 1997. Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 *in vitro*. J Bone Miner Res, 12(8): 1174~1188

Shukunami C, Shigeno C, Atsumi T et al. 1996. Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 *in vitro*: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. J Cell Biol, 133(2): 457~468

Siva JM, Day SH, Nicoll-Griffith DA. 1999. Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes. Chem Biol Interact, 121: 49~63

Suzuki A Nakauchi H. 2002. Identification and propagation of liver stem cells. Semin Cell Dev Biol, 13: 455~461

Tong JZ, De Lagausie P, Furlan V et al. 1992. Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. Exp Cell Res, 200: 326~332

Vunjak-Novakovic G, Martin I, Obradovic B et al. 1999. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and

mechanical properties of tissue-engineered cartilage. J Orthop Res, 17(1): 130~138

Xu C. Police S. 2002. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cell. Circ Res, 91(6): 501~508

Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S et al. 2002. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. Stem Cells, 20(2): 146~154

Yang ZM, Xie HQ, Li T 2000. Tissue engineering of the musculoskeletal system-Basic research and clinical applications. Hand Surg, 5(1): 49~55

Yasui N, Osawa S, Ochi T et al. 1982. Primary culture of chondrocytes embedded in collagen gels. Exp Cell Biol, 50(2): 92~100

Zhu YB, Gao CY, He T et al. 2004. Endothelium regeneration on luminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin. Biomaterials, 25: 423~430

Zimmermann WH, Didie M. 2002. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. Circulation, 106(suppl I): 151~157

Zimmermann WH, Fink C. 2000. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. Biotechnol Bioeng, 68(1): 106~114

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.Tissue Eng, 7(2): 211~228

第 10 章　干细胞的保存与复苏

造血干细胞移植是治疗恶性血液系统疾病、肿瘤放化疗及重症放射病的有效方法。然而，由于组织相容性抗原的存在，在同种异基因干细胞移植后常发生严重的移植物抗宿主病(GVHD)导致移植失败。寻找与患者组织相容性抗原完全匹配的造血干细胞十分困难，需要较长的时间，为此，开展干细胞的保存是使这类细胞择期为患者移植的重要措施。

10.1　造血干细胞低温保存的生物学基础

10.1.1　低温损伤

低温损伤是指细胞在降温复温过程中所受到的损伤，甚至导致细胞死亡。Lovelock认为，过慢的冷冻过程造成电解质浓度的增高，导致细胞膜脂蛋白复合体的破坏和膜的分解。Meryman 认为，当细胞膜脱水收缩达到临界最小体积时，会使细胞膜的渗透率产生不可逆的致命的增加，原先不能透过膜的溶液也变成可渗透的，造成细胞死亡。Mazur等则认为造成冷冻损伤有两个独立的因素：一个是胞内冰的形成(intracellar ice damage)，这是过快冷却所产生的，冷却速率越快，此损伤越大；另一个是“溶质损伤”(solute damage)或称“溶液损伤”(solution damage)，这是由过慢冷却所产生的，它使细胞在高浓度的溶液中暴露的时间过长而遭损伤，冷却速率越慢，此损伤越大。

当然，细胞在复温过程中同样可能遭受损伤而死亡。如经冷冻后膜的渗透率变化了，可能造成渗透率过大或过小，甚至完全没有渗透功能。有的细胞虽渗透率未变，但却在复温过程中产生细胞溶解。

除了冷却和复温过程外，还有许多因素会造成细胞的损伤，如抗冻剂的种类，浓度及其加入、取走的方式；过高的储存温度；寒冷损伤和冷休克等(李光武 1998)。

10.1.2　玻璃化保存

玻璃化(vitrification)是指液体转变为非晶体(玻璃态)的固化过程。它和常见的液体转变为晶体或部分结晶的固体的冻结(freezing)过程不同，玻璃态固体分子之间的关系和液态无明显变化，而一般的晶体分子之间的关系和液态相差甚远。玻璃化比冻结固化方法引起的结构变化要小，因而是一种较理想的低温保存途径(李光武 1998)。

10.2　冷冻保护液的选择

随着快速降温冷冻，组织细胞内的水(溶剂)由液体变为固体(冰)，也即形成冰晶而导

致细胞损伤。特别是在解融过程中温度逐渐升高时，或降温冷冻过程中温度较低的状态下，最容易发生细胞冷冻损伤。如冷冻速度缓慢或比较适宜，细胞内可能不出现冰晶，但细胞的内环境却处在不利于细胞生存的生化和物理条件之下。这些变化包括：细胞内溶质不断浓缩、脱水、pH 变化，以及整个细胞萎缩。细胞内的这些变化必然影响细胞的生存能力。同时，由多细胞构成的组织和器官的生存力也必然受到有害的影响。因此，要减少冷冻和解冻过程中组织和细胞的损伤，冷冻保护液的使用是必不可少的。

依据冷冻保护液对细胞膜的穿透性大小，一般将其分为两大类，相对分子质量较低的一类称为穿透性或细胞内低温保护液(permeating、penetrating 或 intracellular)，相对分子质量等于、大于或相似于蔗糖(相对分子质量为 342)的另一类，也有人称为非穿透、不穿透性、细胞外或接触性冷冻保护液(nonpermeating、nonpenetrating、extracellular 或 contact cryoprotectant)。

10.2.1 胞外保护液

大分子化合物虽然具有低温保护作用，但与小分子胞内冷冻保护液相比，其药理作用相对不活跃。这类药剂不能通过细胞膜和毛细血管内皮，也就很难通过药物灌注、渗透发挥保护作用，因此，限制了这类药物作为器官的冷冻保护液应用。常用的胞外冷冻保护液有葡聚糖、羟乙基淀粉、聚乙烯吡咯烷酮等。

10.2.1.1 葡聚糖

葡聚糖也称为右旋糖酐，是由很多 *D*-葡萄糖多糖构成的，根据其平均相对分子质量的大小，临床上用来扩充血容量。或在器官灌注液中作为膨胀剂。葡聚糖分为右旋糖酐 40、右旋糖酐 70、右旋糖酐 75 和右旋糖酐 150(此数据值×1000，即为它们的相对分子质量)。右旋糖酐 40 的相对分子质量接近 4 万，是器官低温保存研究中常用的一种药剂，通常实验研究用的浓度为 150g/L 或更小。理论上，右旋糖酐 40 与其他种类的大分子化合物相比，其优点之一是，在体内实验中可代谢为葡萄糖而排泄。右旋糖酐，尤其是那些相对分子质量大的右旋糖酐和另一些大分子聚合体，可引起巨细胞内的组胺释放，从而导致血管充血扩张。这些现象是大分子药物灌注器官时可能出现的结果。在对狗肾、兔肾应用右旋糖酐和 HES 灌注时，可观察并证实有这一血管舒张反应。灌注这种药物可引起动脉血管扩张，从而提高了肾血流量，但两者仅有右旋糖酐引起的血管舒张反应，能被组胺 H_1 受体阻断剂——苯海拉明所拮抗。

右旋糖酐常常被用作器官灌注液，在器官冷冻前对器官反复进行灌注，使器官功能得到短时间的保护。Wusteman 等曾经实验，将 Heamaccel(一种大分子多肽)、HES 和 Pluronic F108 以完全相同的浓度(30g/L)加入肾脏灌注液内，结果与人工合成的胶体右旋糖酐 150 相比，在体外实验中 37℃条件下肾血管内仍然保留有右旋糖酐时，肾脏的分泌和排泄功能最好。

10.2.1.2 羟乙基淀粉

羟乙基淀粉(HES)是一种多糖衍生物，其平均相对分子质量在 12 万~15 万，HES 是

一种良好的冷冻保护液，尤其是保护红细胞时，浓度为12%~14%的盐溶液，可发挥良好的低温保护效果。HES不具有抗原性，它在体内被α-淀粉酶缓慢分解为糖类。与其他非穿透性保护液相比，其优点是，用它处理过的血液，在输注前不必将其洗除掉。HES像右旋糖酐那样，常被添加到器官灌注液中，以提高胶体渗透压。

10.2.1.3 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)

20世纪70年代开始将PVP用于临床低温保存，是一种有效的冷冻保护液，尤其对血液的低温保护作用良好。但是，PVP在组织内的滞留时间长，输血前必须将其从血液内去除掉。PVP的药理作用之一可能是，在血液内可以加速血浆纤维蛋白原的降解，并可能发挥抗溶血因子的作用。商品出售的PVP的相对分子质量，远远大于冷冻保存实验用的PVP的相对分子质量。此外，某些商品PVP可作为透析液成分，但对某些受冻的组织细胞有毒性。

10.2.2 胞内保护液

小分子化合物要获得满意的低温保护效果，一般需要较高的摩尔浓度(一般 0.5mol或更高)。因此，它们对组织细胞的保护作用有较好的剂量效应关系。这类药物对冷冻组织产生毒性效应的主要机制是，渗透扩散效应。但这一效应并不是对细胞产生毒性的唯一机制。通过缓慢降低低温保护液的浓度，可最大限度地减小保护液对组织的毒性作用。当使用某种溶液处理复温后的组织时，应该在溶液中加入某些非穿透性药物，如甘露醇，以减轻由于渗透压改变而引起的组织细胞肿胀。

常用的胞内型保护液有甘油、二甲亚砜(DMSO)、乙二醇(EG)、乙酰胺、丙二醇(PG)等。此类抗冻剂多属低分子中性物质，在溶液中易结合水分子，发生水合作用，使溶液的黏性增加，从而弱化了水的结晶过程，达到了保护的目的。但其使用浓度、渗入细胞的能力、对水分子活性的影响等各不相同，如甘油适于慢速冷却用，而DMSO却易于渗入细胞，并在常温下稍有毒性。

10.2.3 其他

糖类、有机溶液及电解质。

10.3 冷冻保存方法的选择

10.3.1 程序降温法

程序降温指降温过程采用程序控制，程序结束后将细胞置入液氮或-80℃中保存。当一种细胞悬液或组织被缓慢降温至0℃以下时，首先产生冰晶的部位似乎是在细胞外。继续缓慢降温有利于这些冰晶的增大，而不再产生新的冰晶。细胞内过冷水的蒸汽压较

冰的蒸汽压高，这样就形成了一个促使细胞内水分丢失的作用力，使细胞发生严重萎缩和变形。缓慢降温冷冻的组织特点使细胞萎缩，并有相对较少的大冰晶在细胞外空间内形成。

10.3.2 快速降温法

快速降温冷冻能促使细胞内的冰晶形成，因为这时几乎来不及丢失细胞内的过冷水冰晶即已形成。当温度降至–40℃以下时，细胞内所有的过冷水通过同质成核作用而生成冰晶，或细胞外冰晶的生长穿过细胞膜上的“孔洞”导致细胞内结冰。然而，有些证据认为，只有在细胞损伤之后才会发生这种跨膜的冰核形成。快速降温冷冻组织的特点是，细胞具有相对正常的体积，并且在细胞内、外的空间内均有大量的冰晶分布(刘金刚 1993)。

10.4 冷冻保存的设备

10.4.1 低温冰箱

日本产三洋冰箱(–80℃)。

10.4.2 液氮

液氮主要是用空气的液化和分馏方法取得的。氮的原子序为 7，原子质量为 14.008，它由原子质量分别为 14 和 15 的两种稳定的同位素组成,它们的相对丰度为 10 000∶38。在一般情况下，这两种同位素很难分离。氮的化学性质相当不活跃，且无毒、不爆炸。液氮正常沸点为 77.3K(–196℃)，密度为 810kg/m^3，比水稍轻。液氮是无色、透明的，是被广泛应用的安全、廉价的低温液体(刘金刚 1993)。

10.5 造血干细胞的低温保存方法

10.5.1 胎肝造血干细胞的低温保存方法

1) 胎肝细胞悬液的制备

人胎肝取至水囊引产或剖腹产的 4~6 个月正常胎儿。在无菌条件下从腹腔取出胎肝，同时从心脏取血查胎儿血型。剔除粘连在肝脏表面的结缔组织和胆囊后，将肝脏置于培养皿中剪成小组织块，然后投入装有双层不锈钢(内层孔径为 100 目，外层为 180 目/in^2 (1in^2=6.451600×10^{-4}m^2))的小烧杯。用少量培养液或生理盐水(经细胞培养，热原试验均为阴性)，将组织块冲洗 2~3 次，弃去洗涤液，然后倒入 20ml PRMI 1640 培养液，并用注射器针芯在钢网内将组织块研磨，如此重复 3 次，即可取出胎肝中绝大部分的造血干

细胞。将合并收集的细胞悬液通过 4 号针头的注射器制成单细胞悬液。

2) 冷冻保护液的添加

用 1640 培养液将无菌的保护液(DMSO)配成 20% 浓度，取与胎肝悬液等体积的 20% DMSO，缓慢加入细胞悬液中，室温静置 10min，再将样品放入降温仪中。

3) 降温方法

程序降温法：多采用两步或三步降温法，即开始时从室温以 1~3℃/min 降温，降至 -30℃时，恒温 2min 后改为 5~7℃/min 降至-80℃或-90℃，再转入液氮中(-196℃)长期保存。也有人主张开始降温速度应严格控制在 1~3℃/min，但经过相变(-11~ -15℃)热释放之后即可加速降温速度，余下各阶段对细胞存活影响不大(刘金刚 1993)。

10.5.2 骨髓造血干细胞的低温保存方法

1) 骨髓的采集

骨髓应在手术室内行无菌操作。患者在局麻或全麻下，用骨髓穿刺针在前、后进行多处穿刺抽取骨髓。抽取骨髓用的注射器应肝素化，控制每毫升骨髓的肝素量为 20~40 单位，以防形成凝集。

2) 骨髓的制备

骨髓采集后，用输血滤网除去脂肪，再缓慢地加入与骨髓悬液等体积的 20% DMSO 1640 培养液，然后置于 4℃冰箱中平衡 10min，便可分装于低温保存袋中，细胞浓度应为 5×10^6~10×10^6 个/ml 骨髓悬液。

3) 冷冻方法

将冷冻袋(管)放入已预冷至 4℃程控降温仪内，程序化降温。-1℃/min，降至-30℃，-3~ -5℃/min，降至-80℃，取出后置于液氮气相 30min，再投入液氮内(-196℃)保存。

10.5.3 外周血造血干细胞的低温保存方法

10.5.3.1 外周血的采集

恶性血液病患者采用 CMOP 化疗联合 rhG-CSF(每日 10μg/kg)动员，白细胞升至 5×10^9 个/L 以上时，采用 CS-3000 PLUS 血细胞分离机采集 PBSC，处理血循环总量 7000~16 000ml(根据患者情况设定)，总产品 55~60ml。

10.5.3.2 冷冻方法

目前外周血造血干细胞体外保存主要有两种方法：-196℃程控降温液氮冻存和 -80℃直接保存方法。其中前者以其能长期保存而且细胞损失少作为经典方法在国内外广泛应用(Almici 1997，Broxmeyer 1997)，但缺点是操作复杂，仪器设备昂贵。-80℃直接冻存的方法是从 20 世纪 80 年代发展起来的，其优点是操作简便，费用低而实用，但用该方法进行长期造血干细胞保存研究报告较少，故目前认为-80℃直接冻存适用于较短时间的造血干细胞冻存。冷冻保护液是影响冻存效果的关键之一。

10.5.3.2.1 程控降温，液氮保存

程控降温指降温过程采用程序控制，程序结束后将 PBSC 置入液氮中保存。此时所有的酶活性均被抑制，环境中的射线也不会对细胞造成电离损伤，可较长期保存。该技术仅以二甲亚砜(DMSO)为冷冻保护液，是经典的造血干细胞保存方法。

(1) 配制冷冻保护液：50% RPMI 1640 营养液、20% DMSO、30%人 AB 血清或自体血浆。

(2) 将采集的 PBSC 用 RPMI 1640 营养液调细胞浓度在 2×10^7~1×10^8 范围内，与等量预冷的冷冻保护液混匀，分别注入低温冷冻袋内，并留取检测样品注入冷冻管。

(3) 将冷冻袋(管)放入已预冷至 4℃程控降温仪内，程序化降温。−1℃/min，降至−40℃，平衡 3min，−5℃/min，降至−80℃，取出后放入液氮内(−196℃)保存。存放时间为 5 年。

(4) PBSC 复苏与回输：冻存物自液氮中取出后立即放入 42℃水浴箱中，完全融化后立即快速回输给患者。

(5) 细胞活力测定：将待测样本分别于冷冻保存前与复苏后 0h、3h、6h 采用台盼蓝拒染法检测细胞存活率(吕秀荣 2004)。

10.5.3.2.2 非程控降温，−80℃保存

这是没有速控条件下的冷冻方法，简单可靠，易重复操作。但是由于这种降温方式在降温的过程中降温速度不恒定，冷冻保护液选择和其对细胞回收率的影响备受重视(彭文珍 2003)。

1) *冷冻保护液*

Stiff 报道了以 6% 羟乙基淀粉(HES)、5% DMSO 及 4%人血清白蛋白(ALB)混合物作为冷冻保护液，用非程控降温将骨髓细胞置于−80℃冻存的方法。Halle 等(2004)采用 1% HAS+3.5% HES+ 2.5% DMSO。张俊萍等将 DMSO、HES、ALB 和 HAS 按不同比例组成冷冻保护液，发现 5% DMSO+6% HES+HAS 效果最好。范华骅等研制的 CP80 低温保护液含 7.5%右旋糖酐、6.25% DMSO 和 6.25% ALB，与样品混合后 DMSO 浓度为 5%。

也有选用单一冷冻保护液的。Galmes 等(1995)首先提出以 10% DMSO 为保护液，细胞冷冻后储存于−80℃的方法。Hernandez-Navarro 等以 10% DMSO 和 HAS 混合物为冷冻保护液，将装有 PBSC 的冷冻袋放入 95%甲醇液中，直接置于−80℃保存，细胞回输后造血恢复情况与其他方法无明显差异。叶韵斌等(2000)对使用 10% DMSO 单一保护液和 5% DMSO+6% HES+4% ALB 混合保护液的效果进行比较，发现在冻存 180 天以内二者差异不大，细胞活力在 85%以上，$CD34^+$阳性细胞比例、粒单集落数均维持治疗水平。

2) *细胞浓度*

临床冻存 PBSC 常采用 0.5×10^8~1.0×10^8 个/ml 的细胞浓度。

10.5.3.2.3 非冷冻保存

McElwain、Mangalik、Burnett 等分别将骨髓造血干细胞在 4℃保存 8h、72h 和 48h 后进行回输，并取得了成功。非低温 4℃保存 PBSC，简化了移植过程，无需加入冷冻保护液，避免冻存过程对细胞的损害，仅需要骨髓保养液，可减少回输时的毒副作用；减少 PBSC 在体外污染的机会；有利于造血重建。因此它是一种简便可行，安全可靠，经济有效的体外保存方法。缺点是保存时间较短，不宜超过 72h，当预处理方案为 3~4 天

时可考虑选用此方法(彭文珍 2003)。

10.5.4 脐带血造血干细胞的低温保存方法

10.5.4.1 脐带血的采集与分离

1) 脐带血的采集

用密闭式收集法采集顺产或剖宫产的新生儿的脐带血。孕妇年龄小于35岁、足月妊娠、无并发症、产前血液检查Hb>90g/L、病毒检测HbsAg、HCV、anti-HIV1/2抗体、梅毒阴性。孕妇及丈夫均无遗传性疾病家族史。采用枸橼酸钠腺嘌呤保护液(citrate phosphate dextrose adenine, CPDA)抗凝的密闭式血袋在胎盘娩出前从脐带断端远离新生儿侧采集。采集后室温保存，18h内运输至脐带血保存库。

2) 脐带血的分离

采用6%(质量分数)羟乙基淀粉(HES，平均相对分子质量480 000，Hespan，Dupon，美国)沉降后一次离心方法去除绝大多数红细胞及大部分血浆。具体方法：每份脐带血按体积比 1∶4 的比例加入脐带血内，充分混匀，垂直倒置悬挂，使红细胞自然沉降20~30min，直至红细胞界面不再下降时，去除红细胞。再将富含有核细胞的血浆在10℃下400*g*离心10min，沉降有核细胞。用血浆积压器去除部分血浆。体积为30~40ml。以上操作均在采集袋中操作(刘开彦 2003)。

3) 脐带血直接保存

作者所在实验室从医院取回的脐带血未经任何处理直接加入等体积的保护液，液氮保存取得较好的效果。

10.5.4.2 冷冻方法

10.5.4.2.1 程控降温深低温保存法

保护液配方：20%二甲基亚砜(DMSO，Sigma公司)，80% TCE。

在冰水浴中，将浓缩的有核细胞加入等体积的低温保护液(DMSO终浓度为10%)，混匀，样品放入DW微机降温仪中，以1℃/min的速度降温至−40℃，然后以5℃/min的速度降温至−80℃后取出，置液氮中保存，有核细胞终浓度为$(2.34\pm2.06)\times10^9$个/L(马庆 2003)。

10.5.4.2.2 非程控降温深低温保存法

下面介绍几种不同保护液组方的保存方法：

(1) 保护液配方：20% DMSO，12%右旋糖酐(dextran，Sigma公司)，生理氯化钠溶液。

在冰水浴中，将浓缩的有核细胞加入等体积的低温保护液(DMSO终浓度为10%)，混匀，置−80℃冰箱存放4h，再置液氮中保存，有核细胞终浓度为$(2.34\pm2.06)\times10^9$个/L(马庆 2003)。

(2) 与脐带血等体积的1640培养液，ACD保养液10ml，20% DMSO，混匀，缓慢加入到脐带血中(DMSO的终浓度为10%)，静止5min，放入液氮气相中，30min后投入液氮。

(3) 保护液配方：10% DMSO，12%右旋糖酐，5%白蛋白，生理氯化钠溶液。

冰水浴中，将浓缩的有核细胞加入等体积的低温保护液(DMSO 终浓度为 5%)，混匀，置-80℃冰箱保存，有核细胞终浓度为(2.34±2.06)×10^9个/L(马庆 2003)。

10.5.4.3 复温

由于保存方法的不同，复温的形式有多种。

1) 不去除保护液

从液氮中取出样品，在 37~42℃水浴下快速复温，时间不超过 5min。过滤脐带血，将其置入消毒过的输液瓶里，封口，待患者使用。

2) 去除保护剂

取出样品复温，水浴温度控制在 41℃，每份脐血均可在 2min 内冻融。加入等体积的 5% 白蛋白和 10% LMD 混合液，混匀平衡 5min 后离心去 DMSO，再用 LMD 调细胞悬液(李光武 1998)。

(郭 永 韩 颖)

主要参考文献

李光武，郑从义，唐兵. 1998. 低温生物学. 长沙: 湖南科学技术出版社

刘金刚，刘作斌. 1993. 低温医学. 北京: 人民卫生出版社

刘开彦，高志勇，姜永军等. 2003. 脐带血造血干细胞的采集、浓缩与低温冷冻保存. 北京大学学报(医学版), 35(2): 119~122

吕秀荣，刘洋，黄平. 2004. 外周血造血干细胞-196℃保存方法的建立.中国预防医学杂志, 5(4): 312~313

马庆，范华骅，林俊杰等. 2003. 脐血造血干细胞低温保存方法的探讨. 临床输血与检验, 15(4): 248~250

彭文珍. 2003. 外周血造血干细胞体外保存的研究进展. 中国肺癌杂志, 6(6): 242~244

叶韵斌，陈强，陈明水等. 2000. 外周血干细胞冻存的探讨. 中国肿瘤临床与康复, 7(4): 38~40

Almici C, Carlo-Stella C, Wagner JE et al. 1997. Clonogenic capacity and *ex vivo* expansion potential of umbilical cord blood progenitor cells are not impared by cryopreservation.Bone Marrow Transplant, 19: 1079

Broxmeyer HE, Cooper X. 1997. High-efficiency recovery of immature hematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years. Clin Exp Immunol, 107(suppl1): 45

Galmes A, Besalduch J, Bargay J et al. 1995. A simplified method for cryopreservation of hematopoietic stem cells with-80 degrees C mechanical freezer with dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant.Leuk Lymphoma, 17(122): 181~184

Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W et al. 2001. Uncontrolled-rate freezing and storage at-80 degrees C, with only 3.5-percent DM_2SO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. Transfusion, 41(5): 667~673

Rubinstein E, B roxmeyer HE, A uerbach AD et al. 1995. Processing and cryopreservation of placental / umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc Natl Acad Sci, 92: 10119~10122

第 11 章　干细胞治疗的临床前研究

细胞治疗(cytotherapy，CYT)是应用具有特定功能的细胞群或细胞克隆治疗肿瘤、感染、自身免疫性疾病、基因缺陷等疾病的一种涉及生物免疫学和基因学的治疗手段。在经历了含成熟血细胞的全血输注的第一代细胞治疗及以骨髓和外周血干细胞移植为代表的第二代细胞治疗后，干细胞因其高度的自我复制和多向分化潜能，作为细胞工程及组织工程的最佳种子细胞备受瞩目，随着对干细胞特性的深入了解，干细胞及其分化的各阶段功能细胞将成为细胞治疗的重要细胞来源。而分子生物学、细胞生物学、免疫学、工业材料、计算机技术等的高速发展，使干细胞的分离纯化成为现实；多种重组细胞因子的发现与克隆，长期细胞体外培养体系的建立与完善，使得干细胞工程更加易于操作与应用，由此产生了第三代细胞治疗——在分离纯化少量干细胞的基础上，通过细胞工程技术，利用其高度扩增/增殖能力和多向分化潜能进行体外扩增和(或)定向诱导分化，从而在短时间内产生大量的目的细胞回输体内参与治疗。以此为目的的干细胞工程几乎涉及人体所有的重要组织和器官，为人类面临的大多数医学难题如心脏疾患、自身免疫性疾病、恶性肿瘤、运动器官损伤、老年性痴呆、严重烧伤、脊髓损伤、遗传性缺陷等疾病的治愈带来希望。

在 21 世纪，随着生命科学技术的发展，第三代细胞治疗及用于细胞治疗的细胞制品的研究将逐步规范化。由于细胞治疗的最终制品不是某一种单一物质而是一类具有生物学效应的细胞，其制备技术和应用方案具有多样性、复杂性和特殊性，具体的操作过程和最终制品必须制定并严格执行标准操作程序，并进行完善的临床前研究，以确保细胞治疗的安全、有效。

11.1　有效性研究

细胞治疗具有多种不同的类型，主要涉及以恢复人体正常生理机能为治疗目的的生理性细胞输注，包括体内移植体外加工过的骨髓细胞或造血干细胞，体内植入经体外操作过的细胞群，如肝脏细胞、肌细胞、胰岛胞、软骨细胞等；或者是以杀伤病理性细胞为目的的效应细胞输注，包括体内回输体外激活的单个核白细胞，如淋巴因子激活的杀伤(lymphokine-activated killer, LAK)细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte，TIL)、单核细胞、巨噬细胞或体外致敏的(*in vitro* sensitized，IVS)杀伤细胞，体内接种体外处理过的肿瘤细胞(瘤苗)等。应根据不同治疗类型和治疗目的对所选用的细胞和(或)细胞群进行有效性研究与评价。

11.1.1　干细胞的基本生物学特性

多向分化潜能和自我更新是干细胞的基本特点，具体来说，干细胞具有以下生物学

特性：①干细胞属非终末分化细胞，终生保持未分化或低分化特征，缺乏分化标记；②在机体的数目、位置相对恒定；③具有自我更新能力；④能无限地分裂、增殖，可连续分裂几代，也可在较长时间内处于静止状态；⑤具有多向分化潜能，能分化为各种不同类型的组织细胞，即具有分化发育的可塑性，在特定环境下，能被诱导分化成在发育上无关的细胞类型，其分化受其所处周围微环境的影响；⑥分裂的慢周期性，绝大多数干细胞处于 G_0 期；⑦通过两种方式生长，一种是对称分裂，形成两个相同的干细胞，另一种是非对称分裂方式，非对称分裂中的一个保持亲代的特征，仍作为干细胞保留下来，另外一个子细胞不可逆地走向分化的终端成为功能专一的分化细胞。

干细胞通常分为胚胎干细胞和成体干细胞两大类。胚胎干细胞具有发育的全能性，在一定条件下可以向 3 个胚层的组织和细胞分化，但是胚胎干细胞来源特殊，并且存在伦理道德上的约束，限制了其在临床中的应用。成体干细胞存在于多种组织中，它们通过取代失去生理活性的细胞或修复损伤的途径来维持组织内环境的稳定。成体干细胞可以在体外根据需要大量培养扩增，且不存在伦理道德问题，在特定条件和环境下可以分化为特定类型的细胞，直接用于体内组织的原位修复，为组织缺损、功能障碍、遗传缺陷等疾病的细胞治疗提供了新的细胞来源和治疗策略。细胞治疗通常采用的种子细胞主要为成体干细胞中的造血干细胞和间充质干细胞。

11.1.2 干细胞的鉴定

干细胞作为细胞治疗的种子细胞存在于体内的多种组织中，对于不同的细胞治疗采用的干细胞也不同，如何科学、准确地对干细胞与其他细胞及不同的干细胞之间加以区分是细胞治疗中的关键问题，也一直是研究者不断探索的课题。

过去人们主要利用干细胞的增殖周期性，采用标记滞留细胞的分析方法来识别在体的静息干细胞，或利用干细胞的自我更新能力，观察其在体外培养时表现出的无限增殖能力来识别离体的干细胞。目前常用的方法是依靠干细胞的表面标志来区分和鉴定各种干细胞。干细胞的表面标志是指覆盖在细胞表面的受体，它能选择性地结合或黏附其他信号分子。目前已发现了干细胞表面的许多不同类型的受体，利用单克隆抗体的特异性和多样性，应用不同抗体的合理组合可以区分干细胞和其他细胞，根据干细胞表面标志还可以分离不同类型的干细胞及其亚群。抗体介导的细胞分离技术主要有：抗体/补体介导细胞溶解法、流式细胞仪细胞分选法、平面黏附分离法和免疫磁珠分离法等，具体分离方法和内容参见本书第 1 章。

11.1.3 体外有效性研究

干细胞是具有无限自我复制、高度增殖和多向分化潜能的细胞群体，正常状态下大多处于休眠状态，在病理状态或外因诱导下可表现出不同程度的更新和再生能力。在分离干细胞的基础上，运用组织工程和基因工程技术，体外对干细胞进行诱导分化和人为改造(如导入目的基因)，以便用于体内组织缺陷性疾病的细胞替代治疗和基因治疗，为某些疾病的临床治疗开拓新的途径。在进入体内进行治疗前，必须对体外诱导分化的干

细胞或人为改造的细胞进行有效性研究，观察其是否具有相应的功能或者能产生相应的生物学效应。

11.1.3.1 体外扩增后的造血干细胞(hematopoietic stem cell，HSC)生物学效应评价

1) 集落形成(colony-forming unit，CFU)实验

根据培养细胞经刺激后在体外形成的造血集落，确定其中是否含有该系的祖细胞及其数量，包括混合系 CFU-Mix、粒系 CFU-GM、红系 BFU-E、巨核系 CFU-Meg 等，具体的实验操作方法请参见本书第 4 章相应内容。

2) 长期培养起始细胞(long-term culture initiating cell，LTC-IC)检测

LTC-IC 是造血干/祖细胞在骨髓基质上培养 5~8 周后，种植于含有细胞因子的培养基中可产生 CFU 的一组造血细胞群，是对不同生长因子敏感的富含 $CD34^{+}$细胞的同种细胞群，它代表在体外可以检测到的最原始的造血祖细胞。LTC-IC 检测是目前体外检测人类造血干细胞质量的最佳方法之一，具体实验操作方法请参见本书第 4 章相应内容。

3) 高增殖力集落形成细胞(high proliferative potential colony forming cell，HPP-CFC)活力检测

HPP-CFC 在人和小鼠骨髓、胎肝、脐血以及动员后的外周血培养中存在，是由于骨髓细胞在多种造血刺激因子存在时能在体外半固体培养后形成大集落(直径 0.5mm，约 5×10^{4} 个细胞)而得名。HPP-CFC 具有向髓系和淋巴系细胞分化的潜能，并具有多因子反应性，也属于早期的造血祖细胞。集落培养的计数时间，小鼠为 14 天，人为 21~28 天。

11.1.3.2 体外扩增后的间充质干细胞生物学效应评价

1) 集落形成(colony-forming unit fibroblast，CFU-F)实验

通过检测培养细胞的 CFU-F 形成，评价间充质干细胞(mesenchymal stem cell，MSC)的质量。具体实验方法请参见本书第 4 章相应内容。

2) 体外定向诱导分化实验

由于 MSC 在形态上与成纤维细胞、内皮细胞较为接近，同时 MSC 缺乏特定的表面标志，因此利用 MSC 的分化潜能，体外在不同的诱导条件下诱导其向成骨、成软骨、成脂肪或成肌细胞分化是鉴定和评价 MSC 的最科学的证据，也是 MSC 作为种子细胞应用于组织工程、细胞工程以及应用于临床治疗的基础。具体实验方法请参见本书第 4 章相应内容。

11.1.3.3 体外诱导分化细胞的生物学效应评价

1) 体外诱导分化粒细胞吞噬细菌功能测定

利用 SCF 或 TPO 加入含有 G-CSF、GM-CSF、IL-3 的细胞因子组合中，可诱导骨髓、外周血或脐带血来源的 $CD34^{+}$细胞向粒系细胞分化，5~7 天后，体系中粒细胞生长呈现优势，在生成粒系祖细胞的同时有大量成熟的中性粒细胞出现，可应用大肠杆菌吞噬实验来测定体外诱导分化的粒细胞的功能，具体实验方法和步骤请参见本书第 4 章相应内容。

2) 单向混合淋巴细胞培养(mixed lymphocytes culture，MLC)方法

(1) 取正常成人外周静脉血，其中部分血型为 O 型，肝素 25U/ml 抗凝。

(2) 用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞后，再用含 20%人 AB 型血清的 RPMI 1640 培养液重悬细胞，调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml。

(3) 取一部分 O 型外周血分离的淋巴细胞悬液用直线加速器的 X 射线进行照射，剂量为 25Gy，剂量率为 2.5Gy/min，作为刺激细胞，保留其作为抗原的刺激能力。

(4) 另一部分 O 型血分离的未照射的淋巴细胞作为反应细胞。

(5) 将待检测的诱导分化细胞悬液调整至 1×10^6 个/ml，取正常成人外周血分离的淋巴细胞悬液及诱导分化细胞悬液各 50μl 与等体积刺激细胞悬液混合培养，观察外周血淋巴细胞和诱导分化细胞的淋巴细胞反应能力。

(6) 同样取正常成人外周血分离的淋巴细胞和待检测的诱导分化细胞各 50μl 与等体积反应细胞混合培养，观察外周血淋巴细胞和诱导分化细胞的刺激能力。

(7) 以正常成人外周血淋巴细胞的刺激能力和反应能力为对照，评价体外诱导分化细胞的淋巴细胞刺激能力和反应能力。

11.1.4 体内有效性评价

在细胞分离纯化和体外定向诱导分化的基础上，将诱导分化的细胞通过不同的途径移植或回输到疾病/损伤动物模型相应部位检测细胞治疗的效果，这是体内有效性评价常采用的方法。

11.1.4.1 选择实验动物应遵循的原则

根据实验目的和要求选取合适的实验动物，用较少的人力、动物和时间，以最小的代价最大限度地获得可靠的实验结果。常用的原则如下。

1) 近似性原则

医学领域研究的根本目的是要解决人类疾病的预防和治疗，因此应选择那些结构、机能、代谢和人类相似的动物进行实验。实验动物进化阶段愈高，其功能、结构愈复杂，反应也愈接近人类。同时还应采用与临床实际应用相同的途径进行实验。

2) 差异性原则

各种动物之间在基因型、组织型、代谢型、易感性等方面的差别也是实验的可比性内容。当研究过程要求以这种差异为指标或特殊条件时，选用不同种系实验动物某些特殊反应，更适合于不同研究目的的需求。

3) 易化原则

研究时应选择那些既能满足实验要求，结构功能又简单，便于实验分析的动物，因为进化程度高，结构功能复杂的动物在实验中有时会造成条件不易控制，失去可比性，从而给实验结果的分析带来困难。

4) 相容和匹配原则

在设计实验动物时，所选用的动物的品质要与实验设计的目的、实验者的技术、方法及实验条件等相匹配。避免应用高精度仪器，先进的技术方法，高纯度的试剂与低品质，非标准化，反应性能低的动物相匹配造成浪费，反之亦然。

5) 可获性原则

实验动物选择时，应尽量选择比较容易获得的符合实验设计要求的动物种类。在生物学实验中应用广泛的实验动物，如啮齿类，繁殖周期短，饲养繁殖容易，遗传和微生物控制方便，遗传背景资料清楚，是一类比较容易获得的实验动物。灵长类大型实验动物，虽然在许多方面有着不可替代的优越性，但由于繁殖周期长、繁殖率低、饲养管理困难、价格昂贵等因素影响了其易获性。

6) 重复性和均一性原则

生物医学实验应选用标准化的实验动物模型，从而能够排除因遗传上的不均质引起的个体反应差异，排除动物所携带的微生物、寄生虫和潜在疾病对实验的影响，获得具有较好重复性和均一性的实验结果。

7) 其他原则

除上述原则外，还应注意动物的性别选择、年龄要求、体重、品系、生理状况、营养状况、饲养环境等对实验的影响，按照实验的要求进行选择。

11.1.4.2 常用动物、给药途径及容量(表 11.1)

表 11.1 不同动物不同给药途径常用容量和最大容量(ml)

给药途径	小鼠	大鼠	豚鼠	家兔	狗
平均体重	20g	200g	400g	1.5kg	12kg
灌胃	0.2~1.0	1.0~4.0	1.0~5.0	5~10	50~100
腹腔内注射	0.2~1.0	1.0~3.0	2.0~5.0	5~10	5~15
肌内注射	0.1~0.2	0.2~0.5	0.2~0.5	0.5~1	2~5
静脉内注射	0.2~0.5	1.0~2.0	1.0~5.0	3~10	35~50
皮下注射	0.1~0.5	0.5~1.0	0.5~2.0	1~3	3~10

11.1.4.3 细胞治疗临床前研究中常用疾病/损伤动物模型的建立

在细胞治疗的临床前研究中常用的疾病/损伤动物模型主要涉及皮肤、骨和软骨、神经、肝脏、胰腺、血液、心脏等组织器官，我们实验室已经建立了部分组织器官的疾病/损伤动物模型，还有部分组织器官的疾病/损伤动物模型已有成熟的技术方法制作，请参考苗明三主编的《实验动物和动物实验技术》一书。

11.1.4.3.1 皮肤损伤动物模型

用于细胞治疗的临床前研究的皮肤损伤动物模型主要包括烧伤、烫伤及创伤动物模型三大类。其中烧伤动物模型常用的实验动物为小鼠、狗和家兔，利用燃料涂在动物体表的毛发上，通过燃烧造成体表皮肤的烧伤，烧伤面积及烧伤程度可根据研究需要，通过限定燃料的数量、烧伤区域及燃烧时间来控制。如用混合燃料 0.6ml 涂于小鼠背部，燃烧 20s，可造成面积为 6cm^2，约占体表面积的 12%的 III 度烧伤。燃料造成的烧伤动物模型通常在烧伤后较短时间进入休克抑制期，如不及时给予治疗措施将很快死亡。

烫伤动物模型通常选用小型猪和家兔，利用不同温度的热水，浸泡不同的时间可造成小型猪和家兔的烫伤模型。如采用 58℃热水，将小型猪头顶、颈、背部及腹部两侧浸

入其中 30s，可造成 II 度烫伤，而家兔在 80℃热水中烫 10s，可造成浅 II 度烫伤，若在 80℃热水中烫 20~40s，则可导致深 II 度烫伤。

皮肤创伤模型通常是将大鼠背部剪去一定面积的皮肤而造成。

11.1.4.3.2 骨和软骨损伤动物模型

骨损伤模型常利用家兔、豚鼠、大鼠及小鼠来制备，选择桡骨、股骨作为骨折部位，方式有骨缺损或闭合性人工骨折。软骨损伤模型则选用家兔作为动物模型，麻醉后将兔髌韧带延长，使髌骨关节压力减小，从而诱发关节软骨损伤；也可将兔膝进行 90°屈曲功能位和伸直位两种形式固定，造成软骨损害。

11.1.4.3.3 神经损伤与疾病动物模型

1）帕金森病(Parkinson's disease，PD)大鼠模型

雄性 Wistar 大鼠 200~250g，实验前检测无异常行为。3.5%水合氯醛腹腔内注射麻醉(1ml/100g)后固定于脑立体定位仪，参照 Paxino 和 Watson 鼠脑立体定位图谱(Paxion，1997)，保证前后囟水平，以前囟为坐标，确定右侧黑质定位坐标为前囟后 4.8mm，矢状缝右侧 2.2mm，颅骨下 8.5mm；中脑腹侧被盖核定位坐标为：前囟后 4.8mm，矢状缝右侧 1.2mm，颅骨下 7.8mm。按此坐标开颅并用微量注射器注射多巴胺能毒性药物 6-OH 多巴胺 8μg (溶于 4μl 含 0.2%抗坏血酸的生理盐水中)，注射速度 1μl/min，注射完毕留针 15min，并以 1mm/min 的速度缓慢退针。对照组按上述同样方法和坐标，仅注射含质量分数为 0.2%抗坏血酸的生理盐水 4μl。术后皮下注射氨苄青霉素 10 万单位。1 周后皮下注射阿朴吗啡(0.5mg/kg)以诱导大鼠的旋转行为，计数 30min 内大鼠向毁损对侧连续旋转次数,每周测定 1 次,共测定 4 周,选取平均转数大于 7r/min 者为帕金森模型成功大鼠。

2）横断型脊髓损伤模型

成年雌性 Wistar 大鼠，体重 180~220g，用 3.5%的水合氯醛，按 1ml/100g 的剂量腹腔内注射麻醉动物。手术野周围剪毛备皮，碘伏消毒。按脊柱下胸段定位标志确定手术的脊柱平面。以 T10 棘突为中心，做 3cm 长的纵行手术切口，切开皮肤、皮下组织及深筋膜。切开椎旁肌肉，用乳突拉钩向两侧拉开，显露棘突和椎板。组织剪剪除 T9~T11 棘突，用持针器咬除椎板，充分显露硬脊膜。手术显微镜下沿后正中线纵行切开硬脊膜 3~5mm，显露脊髓。在 T10 椎体水平用虹膜刀片切断脊髓。显微缝合硬脊膜，用缝线标记脊髓横断处，逐层缝合。实验大鼠在围手术期置于 37℃的环境内，以减少动物的死亡。手术后 3 日内腹腔注射青霉素 2000U/100g 体重，每日 2 次；辅助排尿 3 次/天，直至实验大鼠形成反射性膀胱为止；按摩实验大鼠双下肢 3 次/天，每次 5min，以防止深静脉血栓形成。

11.1.4.3.4 心脏疾病动物模型

1）心肌梗死模型

采用冠状动脉结扎法，模型动物可选用大鼠、狗及小型猪。

(1) 大鼠心肌梗死模型。取 200~250g 清洁级雌性 Wistar 大鼠，置于天平上称重量，按照 1ml/100g 腹腔注射 3.5%的水合氯醛，麻醉后仰面固定于平板上，剪去颈部和心前区毛，颈部及左侧胸部备皮、碘伏消毒，颈部沿身体长轴做 1cm 切口，钝性分离软组织，暴露气管，在气管环间做一小横切口，插入 12 号套管针，拔出针芯，观察呼吸情况，左胸第 4 肋间做 2cm 横形切口，钝性分离软组织及肌肉层，连接呼吸机，行正压辅助呼吸；

呼吸机频率为 60 次/min，呼/吸比为 1.5∶1，潮气量为 3ml/次。剪开胸膜，用开胸器撑开第四肋间，暴露心脏，大鼠背部垫高，小心剪开心包，按压大鼠腹部，挤出心脏，用无损伤镊子小心固定心脏，在肺动脉圆锥与左心耳交界稍下 1~2mm 处用 4/0 无损伤线结扎左冠状动脉前降支，迅速将心脏送回胸腔，造成左室前壁心肌梗死(左室前壁变苍白为成功的心肌梗死模型)(图 11.1)，迅速逐层关胸，胸膜、肌肉、软组织、皮肤。观察大鼠呼吸情况，待大鼠自主呼吸恢复撤去呼吸机及拔出气管插管，注意保温，动物苏醒后放入动物饲养笼。术后腹腔注射青霉素抗感染。次日继续观察动物存活情况。

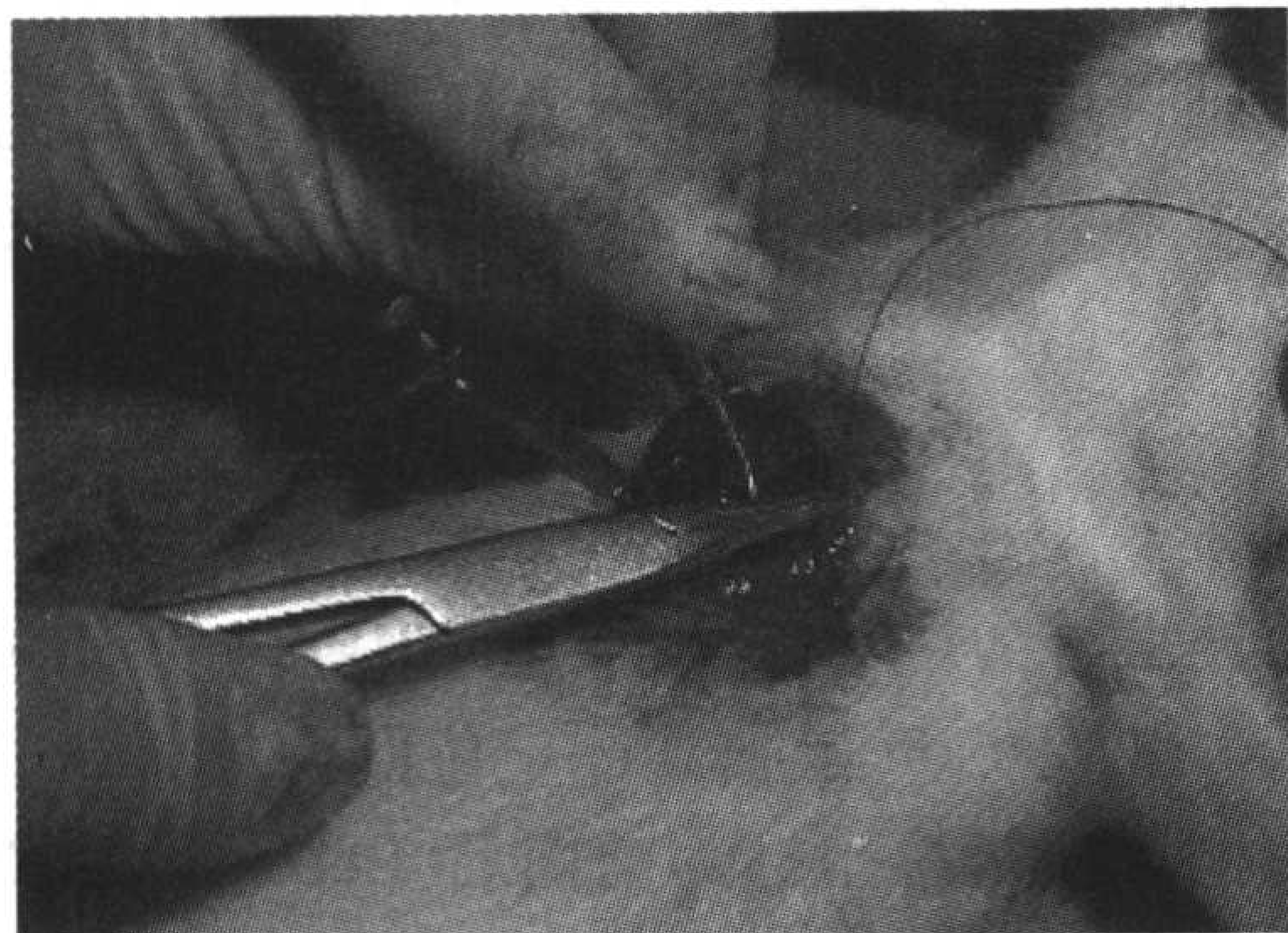


图 11.1　大鼠心肌梗死模型的制作

(2) 小型猪急性心肌梗死模型。小型猪戊巴比妥钠 25mg/kg 肌注加静脉注射复合麻醉，耳静脉建立静脉通路，气管插管，呼吸机辅助通气，通气量 7~9L，心电监测，有创血压监测。左侧第 5 肋间逐层开胸，切开心包，做心包吊床。分离第一对角支与第二对角支间左前降支，用 4.0 Prolene 缝线将 24 号套管针(截去针尖)与前降支共同结扎，约 60min 后抽出套管针使血管重新开放。截取 BMW/ACS 导丝头端(不透 X 射线)部分约 20cm 缝在梗死部位的心外膜上，作为细胞移植时的标记。自主呼吸恢复后脱机，关闭胸腔。超声心动图检查，手术前后抽血动脉血气分析及生化检查。青霉素 320 万单位肌注每日 1 次，连续注射 3 天。

(3) 狗心肌梗死模型。狗麻醉下人工呼吸，从左第 4 或第 5 肋间开胸后，分离出左冠状动脉前降支 1cm 左右，放入压迫器内，当压迫器的气囊膨胀时，压迫血管而阻断血流，短暂阻断可产生心肌局部缺血，长期阻断则产生心肌梗死。

2) 慢性心功能不全动物模型

新鲜配制的阿霉素(必须避光)给不同动物静脉注射，可出现动物急性心肌中毒的表现，即心肌病模型(表 11.2)，如损害进一步加重则可发展成为心力衰竭模型。

表 11.2　阿霉素心肌病模型

动物	给药途径	给药方案	观察指标	主要特点
猴	静脉注射	单次给药后长期观察	心衰临床表现 光镜检查	心肌损害程度与给药剂量成正相关
狗	静脉注射	1.75mg/kg/3 周×7 给药完后观察 3 周	动物临床表现 功能指标 组织学检查	抗氧自由基药 ICRF-187 治疗有效，而乙酰半胱氨酸无效
兔	静脉注射	1mg/kg/周×8	血液动力学指标 RAA 系统生化指标 组织学及尸检等	典型低心输出量心衰模型既可用于研究阿霉素毒性机制，又可以做心衰模型评价药物
大鼠	静脉注射	2mg/kg/周×6~7	离体工作心脏评价生化指标，组织学检查	肉毒碱能对抗阿霉素所致心肌毒性
大鼠	静脉注射	3mg/kg/周×3 给药完后观察 3 周	临床表现，心电图组织学检查	氢吡酮能改善阿霉素心肌病大鼠心功能
小鼠	腹腔注射	15mg/kg 一次给药后观察 5 天	组织学检查 丙二醛含量测定	维生素 E 可降低因阿霉素升高的丙二醛含量

11.1.4.3.5　**糖尿病动物模型**

糖尿病动物模型除了自发性糖尿病的 NOD/SCID 小鼠模型外，还可采用药物致动物的糖尿病，经常使用的药物有四氧嘧啶和链脲佐菌素。

1) 四氧嘧啶糖尿病

四氧嘧啶(alloxan)是一种 β 细胞毒剂，可选择性地损伤多种动物的胰岛 β 细胞。由于 β 细胞损伤致持久的高血糖，形成四氧嘧啶糖尿病。大剂量四氧嘧啶可致大部分 β 细胞破坏，使犬、猫产生永久性糖尿病；但部分啮齿类动物如大(小)鼠形成四氧嘧啶糖尿病可产生自发性缓解，经过一定时间可恢复正常。四氧嘧啶易溶于水及弱酸，水溶液不稳定，易分解成四氧嘧啶酸而失效，应于临用前配成 1%~5%水溶液使用。

2) 链脲佐菌素糖尿病

链脲佐菌素(streptozotocin，STZ)可以选择性损伤胰腺β细胞。动物注射大剂量链脲佐菌素后，可于注药后 48~72h 出现高血糖，尿量也明显增多。若血糖值≥16.67mmol/L 且持续 2~3 天，可认为模型建立(表 11.3)。

表 11.3　四氧嘧啶和链佐霉素的常用剂量和给药途径

动物种属	致糖尿病剂量/(mg/kg)		给药途径
	四氧嘧啶	链脲佐菌素	
犬	50~75	50 或 15× 3	静脉注射
家兔	150~200	—	静脉注射
大白鼠	40~80	50	静脉注射
大白鼠	250	40~65	腹腔注射
大白鼠	200	40~65	皮下注射
大白鼠	50~70	175~200	静脉注射
小白鼠	200	48~60	腹腔注射

链脲佐菌素易溶于水，其水溶液在室温下极不稳定，可在数分钟内分解成气体，故其水溶液应在低温和 pH4.5 的条件下配制并保存，也可与注射前用 0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲溶液(pH4.5)配制成溶液使用。

称取一定量的 STZ，溶于 0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲溶液(pH4.5)中，过滤除菌。取 6~8 周龄小鼠，测其体重及血糖值，并向其腹腔中注入 STZ(150mg/kg)。注入 STZ 2~3 天后，测各只小鼠的体重(略有降低)、血糖值(通常略有升高)，此时可再向小鼠腹腔中注入 STZ(150mg/kg)。一天后检测各小鼠的血糖值，若 BG≥16.67mmol/L，则可认为模型初步建立。待小鼠高血糖值稳定 2~3 天后，可应用此模型。

11.1.4.3.6　**肝病及肝损伤模型**

1) 四氯化碳致急性中毒性肝炎和肝坏死模型(表 11.4)

2) 慢性肝损伤模型

一般选用大鼠作为实验动物，将四氯化碳溶于橄榄油中，由皮下注射 10% 5ml/kg 或 25% 2ml/kg，每周 2 次，连续 3 个月可造成慢性肝脏损伤。

表 11.4　四氯化碳致急性中毒性肝炎和肝坏死模型(苗明三 1997)

动物	剂量	用法	结果
小鼠	0.2% CCl_4 豆油 10ml/kg	腹腔注射 1 次	17h 后血清 GPT 升高，肝 P450，糖原 RNA 减少
	0.1% CCl_4 花生油 10ml/kg	腹腔注射 1 次	16h 后血清 GPT 升高、肝脏细胞浸润、空泡变性、肝小叶中央大片坏死
	0.1% CCl_4 花生油 10ml/kg	腹腔注射 2 次(中间隔 3 天)	第 5 天(末次 16h 后)血清 GPT 升高
	0.2% CCl_4 花生油 10ml/kg	口服 3 次，1、4、7 天各 1 次	末次后 12~24h 血清 GPT 升高，此后迅速降低，至 72h，接近正常，肝脏重量在 24h 最大
	0.12% CCl_4 植物油 10ml/kg	口服 1 次	24h 后血清 GPT、GOT 升高，肝脏细胞脂肪变性、坏死，线粒体肿胀，光面内质网增生
	0.12% CCl_4 植物油 10ml/kg	口服每周 2 次，共 5 次	第 16 天血清 GPT、胆红素升高，肝脏细胞变性、坏死
大鼠	25% CCl_4 0.5ml/100g	皮下注射 1 次 皮下注射 2 次(隔 4 天)	第 8 天血清 GPT 升高，肝脏细胞肿胀、变性，肝小叶中央坏死，肝脏细胞内糖原、RNA 减少
	15% CCl_4 液体石蜡液 1ml/kg	口服 3 次，每隔 3 日 1 次	末次后 16h，血清 GPT 升高，肝脏细胞脂肪变性，肝小叶中央坏死
兔	50% CCl_4 液体石蜡液 0.5ml/kg	皮下注射 1 次	第 4 天、第 7 天血清 GPT、GOT 升高，肝脏细胞疏松、变性，渗出性浸润
	33% CCl_4 花生油 1.5ml/kg	口服 2 次(隔 3 天)	第 7 天血清 GPT 升高，肝脂肪变性、坏死
	33% CCl_4 花生油 1ml/kg	口服 1 次	24h 后至第 9 天，血清 GPT 升高，第 2 天最明显

3) 肝脏大部切除大鼠模型

Wistar 大鼠常规麻醉、固定、消毒、铺巾、备皮后，行上腹正中横行切口，充分暴露肝脏，切口周围以生理盐水纱布保护。依次结扎并切除大鼠肝左叶、中叶及右叶，仅保留尾状叶，肝脏切除比例约为 90%。术后逐层关腹，灯照保温至少 3h，清醒后自由进食水；术后不同时间监测动物的活存和血生化指标的变化。手术示意图如图 11.2 所示。

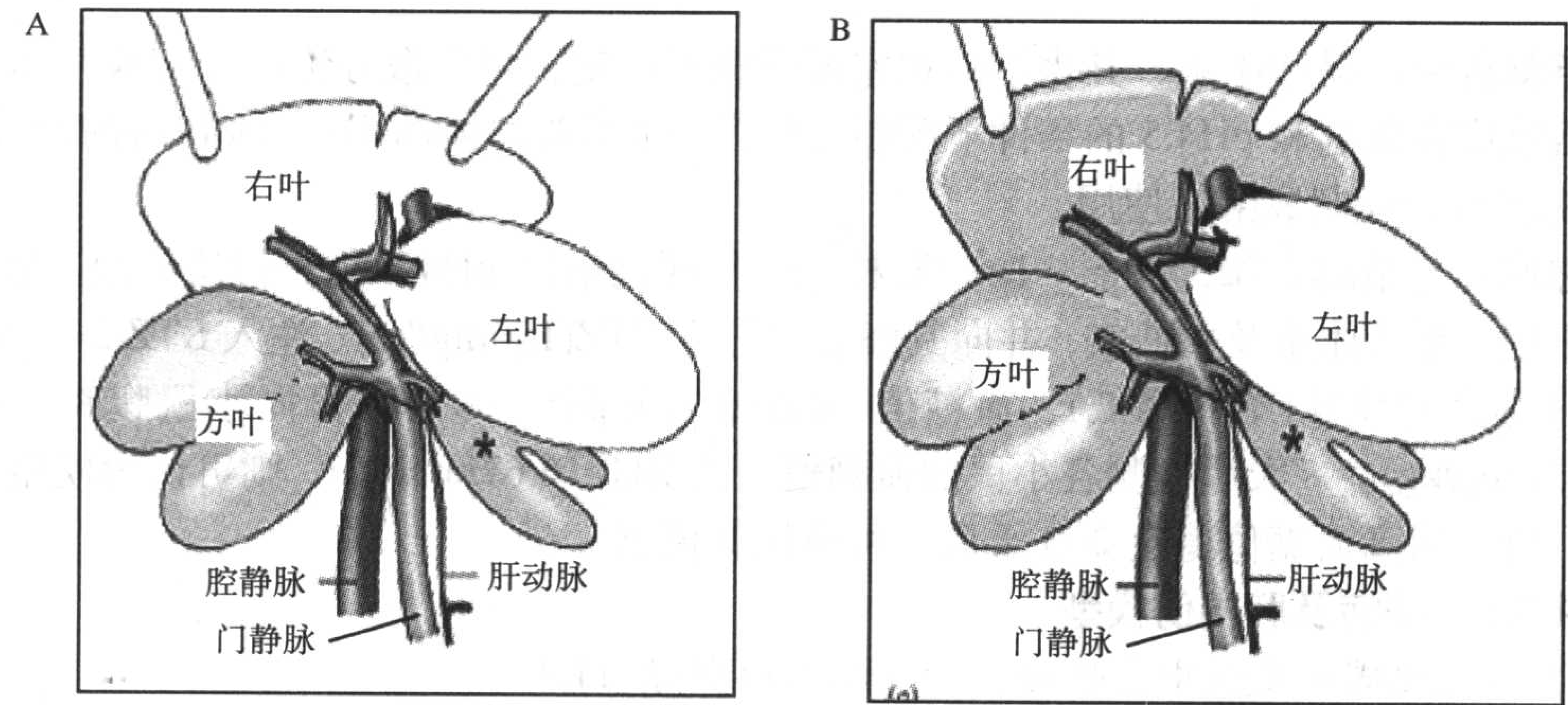


图 11.2　肝脏切除及肝坏死模型制作示意图

A 肝脏部分切除示意图；B 门脉结扎致肝坏死示意图

11.1.4.3.7 血液系统疾病动物模型(苗明三 1997)

1) 白细胞减少动物模型

(1) 辐射所致白细胞减少模型。采用 7.50Gy(剂量率为 450 伦/min 左右时)照射小鼠，照射后 3~5 天，骨髓有核细胞总数下降至最低水平，照射后 7~9 天白细胞下降至最低值。应用此模型可测脾脏系数(脾重/体重)，直接计脾表面 CFU-S 数和测定骨髓 DNA 含量或骨髓有核细胞总数等指标。

(2) 苯致大鼠白细胞减少模型。Wistar 雌性大鼠，静式吸入苯(11.2mg/L 空气浓度)，3h/天，6 天/周，共 2 周，阳性率 95%。潜伏期 14 天，外周血白细胞数下降 1/2，中性白细胞，碱性磷酸酶活性上升，出现中毒颗粒，染色体损伤。骨髓主要表现粒系抑制，红系轻度增生。

2) 马利兰诱发再生障碍性贫血模型

采用小鼠制备再生障碍性贫血模型时，选 12~16 周龄雌性瑞士种小鼠，马利兰腹腔注射，连续 8~9 天，停药后 61~175 天，周围血细胞计数轻度受抑制，其 CFU-S 及 CFU-GM 下降，此种动物称处于再生障碍性贫血潜伏期的小鼠。马利兰单次腹腔注射 35mg/kg，可导致动物白细胞极度减少，皮肤和胃肠道出血和骨髓严重再生障碍。

以家兔制备再生障碍性贫血模型时将马利兰混悬于动物饮水中喂服，当粒细胞或血小板下降至低于 0.5 和(或)100×10^9 个/L 时停药。如达不到标准，可再连续每周给药，此时，兔的骨髓造血干细胞和骨髓增殖能力都受到持久的损害。

3) 苯诱发再生障碍性贫血模型

采用家兔和小鼠制作再生障碍性贫血的模型，通常采用皮下注射方式，将纯苯注射到动物皮下，给药的 2~3 周内动物中性粒细胞数和血小板计数大大降低，导致造血干细胞受损，引起再生障碍性贫血，如不能达到要求时，可增加注射量。

4) 血小板减少模型

血小板减少的模型通常采用抗血小板血清、环磷酰胺等制备，动物选用豚鼠或小鼠，给药方式为腹腔注射，或者采用剂量 7.0Gy ^{60}Co 照射造成小鼠血小板减少模型。

11.1.4.4 评价指标的确定和生物学功能的评价

在体外实验方法选定及疾病或损伤动物模型建立后，相应的评价指标也随之而确立。评价指标与评价的干细胞的生物学特性密切相关，例如，对于造血干细胞，通过模拟体内的造血环境和造血过程，观察造血干细胞的增殖和分化，从而判断是否具有产生造血祖细胞并分化为多个造血细胞系的能力，进而间接反映造血干细胞的存在；或者将造血干细胞移植入 SCID 小鼠体内，观察其是否具有造血重建的功能。

11.2 安全性研究

在进行安全性评价时，实验设计中应充分考虑以下几个影响实验结果的重要因素。首先，动物存在着药物反应性的差异、种属差异以及药物作用于动物时存在时间周期性，并且采用的模型包括整体模型、在体模型、离体器官、细胞模型等，因此应该选择至少两种以上的动物/模型进行验证，同时从现有的可利用的对象中寻找相似的/间接相关的

动物模型来应用。评价中还要注意指标的选择，既要考虑到指标的灵敏性又要考虑特异性，并且尽可能选择定量指标，少用定性指标，同时考虑设计多种指标来证实。在实验中检测量-效关系，尽可能采用与临床给药途径相同的途径进行动物实验。实验中严格遵循随机、对照的原则，采用正确的统计方法，对实验中应用的仪器校准，规范实验操作过程，做好详尽的实验记录。

凡是细胞发生生长或运动的控制持久失调，即称为转化。而转化细胞是在组织培养的条件下，获得了恒定的、可遗传给子代细胞变化的细胞，理论上细胞经过体外处理后均有发生转化的可能。转化细胞具有以下生物学特性：具有无限增殖能力，但转化细胞不一定都永生化；丧失密度决定的细胞生长抑制作用；对血清的依赖型降低；发生细胞形态学的改变；具有成瘤性；细胞核型发生改变；经常伴有细胞膜功能的改变等。细胞的转化涉及病毒 DNA 的整合，端粒酶的活化，生长抑制因子的失活等多方面的因素，因此从以下几个方面对体外培养的细胞进行安全性评价。

11.2.1 体外安全性评价

11.2.1.1 细胞生长特性研究

体外培养时，正常细胞的生命期是有限的，细胞增殖一段时间后，会出现群体生长停滞，即存在细胞复制衰老现象。虽然干细胞具有高度的自我更新能力，在体外的培养过程中能够反复传代，保持其自我更新能力，但是干细胞具有的多向分化潜能使其在培养的过程中，在不同细胞因子诱导下或在不同的微环境中，可向不同类型的组织细胞分化，分化后的细胞与正常细胞的生物学特性相同。因此，对分化细胞生长特性的研究是评价其是否发生恶性转化的常见指标，通常可用细胞体外培养时的生长曲线来观察。

(1) 根据诱导分化细胞的生物学特性，抽取不同的时间点的细胞。

(2) 显微镜下计数细胞的数量及细胞存活率，计数方法及存活率检测方法请参见本书相应章节。

(3) 根据不同时间点细胞数量及扩增时间绘制细胞生长曲线。

11.2.1.2 端粒酶活性检测

端粒是真核细胞染色体末端的一种特殊结构，由 2~15kb 相当保守的$(TTAGGG)_n$重复序列组成，端粒有稳定染色体，防止染色体末端融合，保护染色体结构基因，调节正常细胞生长等多种重要的生物学功能。端粒酶可以自身内源性 RNA 为模板，经 DNA 聚合酶复制产生该重复序列，使端粒延长，延长细胞的寿命。

除了转化细胞外，体内生殖细胞、干细胞、85%的肿瘤细胞(以白血病细胞为例)，甚至某些体细胞(T、B 淋巴细胞)均被检出了端粒酶活性，但仅生殖细胞能完整地保持端粒长度。通过对体外定向诱导分化细胞的端粒酶检测，可观察分化细胞是否具有永生化的倾向及是否具有致瘤性。下面以造血干细胞及体外向红系诱导分化的细胞为例，说明端粒酶的检测方法及步骤。

(1) 取新鲜分离的脐带血单个核细胞、$CD34^+$细胞以及诱导分化 14 天、21 天、28 天的细胞各 1×10^5 个；

(2) 向各组细胞中加入200μl裂解液，冰上孵育30min；

(3) 4℃、16 000*g*离心20min，小心分离上清；

(4) 取抽提的蛋白质产物10μl用紫外分光光度计进行蛋白质定量；

(5) 取待测样品总蛋白各30μg，加入反应混合物25μl，去离子水补足体积至50μl，25℃放置30min；

(6) PCR扩增，反应条件：94℃作用5min之后，94℃、30s，50℃、30s，72℃、90s作用30个循环，72℃延伸10min；

(7) 取15μl PCR产物，聚丙烯酰胺凝胶(12%)电泳，Cybergreen染色，避光30min后观察结果；

(8) 结果判定：细胞在增殖最旺盛时期(体外培养第21天左右)端粒酶表达最高，但随着时间延长，最终检测不出端粒酶活性，表明细胞已基本分化为不具有增殖能力，接近成熟的细胞(图11.3)。

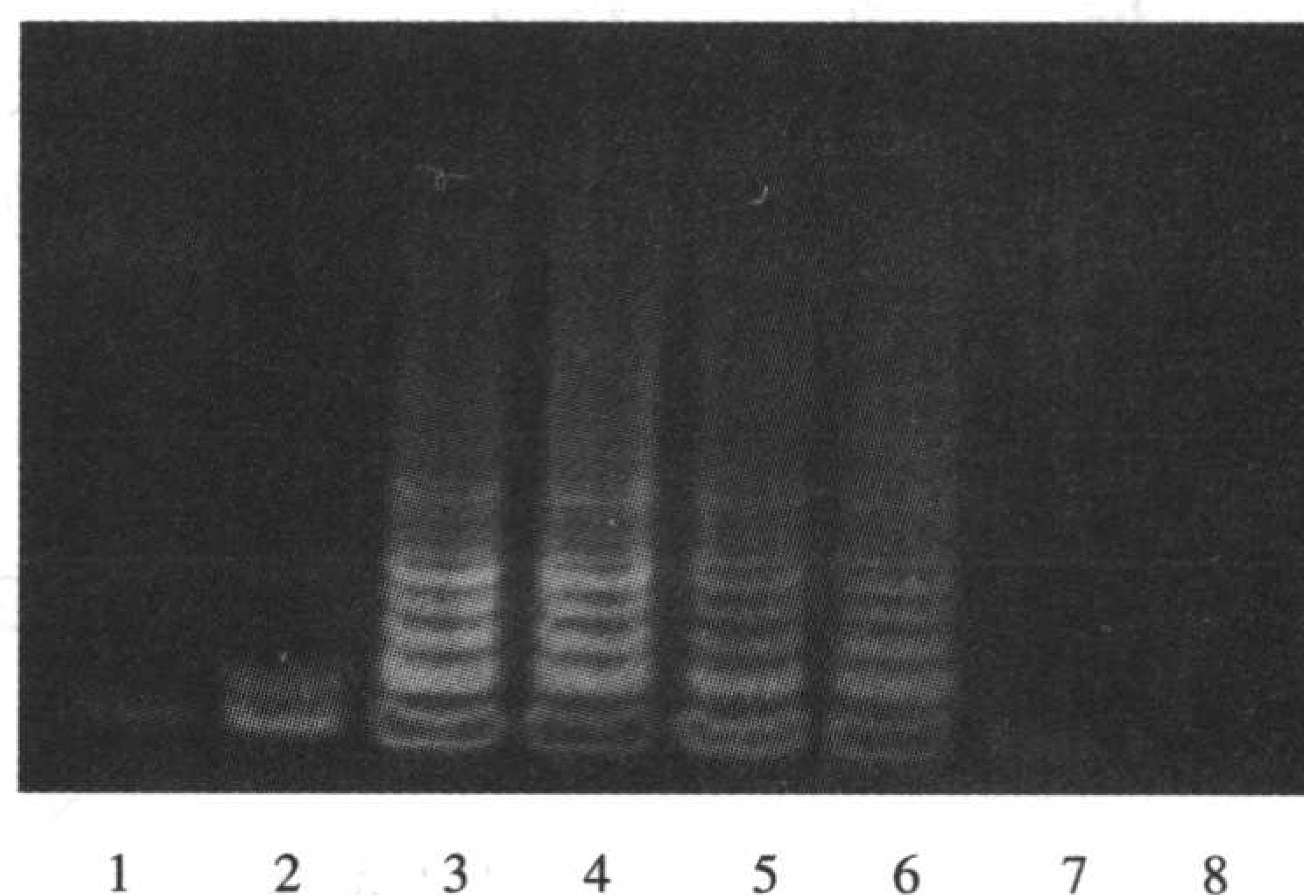


图11.3 诱导分化细胞的端粒酶检测

1. 单个核细胞；2. $CD34^+$细胞；3,4. 诱导分化14天的细胞；5,6. 诱导分化21天的细胞；7,8. 诱导分化28天的细胞；其中4,6,8为红系分化细胞样品

11.2.1.3 部分细胞凋亡相关基因的检测

细胞增殖调控是通过细胞增殖、细胞分化及细胞凋亡之间的平衡来实现的。细胞凋亡是一种基因控制的细胞自主性的死亡过程，是维持内环境稳定的重要机制之一。细胞凋亡功能的抑制将导致肿瘤的发生及免疫功能的异常，而细胞凋亡功能亢进与组织损伤和器官功能衰竭的发病密切相关。当细胞凋亡调控发生紊乱，细胞出现永生化现象，即发生肿瘤。Fas(CD95)是可介导细胞凋亡的一种细胞表面分子，与其配基结合后将启动细胞凋亡的发生，同样caspase-3/CPP32也是启动细胞凋亡的分子，二者均可作为检测细胞凋亡的指标。现以脐带血体外诱导分化为红系祖细胞为例，检测其凋亡相关基因Fas的表达，方法如下：

(1) 分别在0h、24h、48h取诱导分化的红系造血细胞进行计数，调整细胞浓度为1×10^6个/ml，各取500μl分别加入4个离心管中；

(2) 取FITC-CD34、PE-CD95抗体和FITC及PE标记的鼠IgG阴性对照抗体，分别1∶10稀释；

(3) 取稀释后的抗体各10μl分别加入各离心管中，与细胞混匀；

(4) 4℃孵育30min，PBS洗涤2次；

(5) PBS重新悬浮细胞后，流式细胞仪检测CD34、CD95抗原的表达；

(6) 结果判定。

11.2.1.4 培养细胞的染色体核型分析

发生恶性转化的细胞获得了持续生长增殖的能力，具有无限增殖生长性，可长期传代，并多伴有核型的改变，由原来二倍体变为非整倍体。通过检测染色体核型并对其进

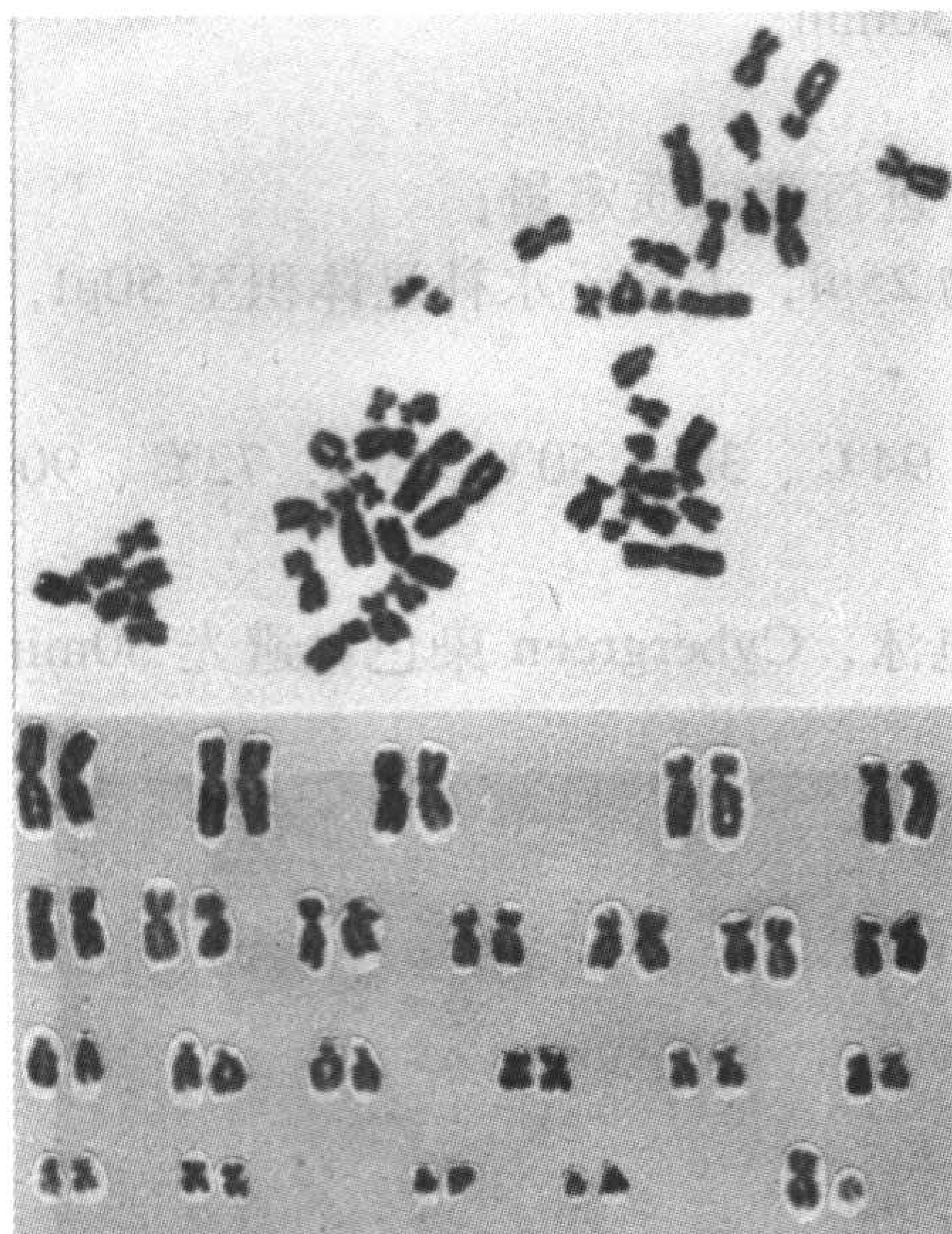


图 11.4　诱导分化细胞的染色体核型分析

行分析，可以判断体外诱导分化的细胞是否发生转化，并获得持续生长增殖的能力(图 11.4)。常用的方法如下：

体外诱导分化细胞在培养 7 天时，取 1×10^5 个/ml 细胞加入终浓度为 2.5μg/ml 的秋水仙胺孵育 3h，然后加入 0.0375mol/L 的 KCl 于 37℃处理 30min，1000*g* 离心 5min，去上清，加入新鲜固定液(甲醇：冰醋酸为 3：1)固定 30min。重复固定 1 次，制成细胞悬液滴片，火焰干燥，100g/L 吉姆萨染液染色，镜下观察。随机分析 100 个中期分裂细胞的染色体核型，计算异常核型出现的比率。

11.2.2　体内安全性评价

11.2.2.1　同种异体细胞移植的免疫学研究

机体的免疫系统是一个相互严密制约、高度分化、不断增殖更新的细胞网络系统，当同种异体细胞进入机体后，有可能刺激机体产生免疫排斥反应，排斥反应发生的快慢及反应的严重程度通常通过动物实验来预测和反映。根据不同的体外诱导分化细胞的生物学特性，选用不同的动物模型进行评价，常用的动物模型请参见本章。

11.2.2.2　一般毒性实验

由于干细胞体外诱导分化的细胞种类、用途、用法及临床疗程等千差万别，体外诱导分化的细胞进入机体后，在体内存活时间的长短、体内各系统的分布、代谢以及对机体可能产生的作用通常采用一般毒性实验来检测。

11.2.2.2.1　急性毒性实验

急性毒性实验是观察动物接受单次细胞治疗后出现的急性毒性反应，包括定性及定量实验。定性实验即观察治疗后，动物有哪些中毒表现，出现和消失的时间过程，可能涉及哪些组织和器官，可能的靶器官是什么，分析中毒死亡原因等(表11.5)。定量实验主要以死亡为评价终点，测定引起动物死亡的治疗用细胞数量，包括致死量、近似致死量和半数致死量。急性毒性实验是临床前安全评价的第一步，具有简单、经济、易行等特点，在安全性评价中具有多方面的意义。可以通过急性毒性实验了解体细胞制剂急性毒性的强弱，获取毒性反应信息，为长期毒性及特殊毒性实验选择剂量提供参考。

表 11.5　急性毒性实验研究的一般观察内容

观察内容	可能涉及的器官、组织、系统
鼻孔呼吸阻塞，呼吸频率和深度改变，体表颜色改变	CNS，感官，神经肌肉等
运动功能：运动频率和特点的改变	CNS，感官，神经肌肉等

续表

观察内容	可能涉及的器官、组织、系统
惊厥(抽搐)：随意肌明显的无意识收缩或惊厥性收缩	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
反射	感观，神经肌肉
眼睑指征	自主神经，出血，感染
心血管指征	CNS、心输出量降低等
唾液分泌	自主神经
竖毛	自主神经
痛觉丧失	感官，CNS
肌张力	自主神经等
胃肠指征	自主神经，便秘，痢疾等
皮肤	刺激性，炎症，致敏等

11.2.2.2.2 长期毒性实验

长期毒性实验是反复多次给药的毒性实验的总称。给药期限的长短，取决于临床实际用药时间的长短和临床研究的阶段而定，在各国药政法中均有具体规定。通常实验选用的动物要求至少两种以上，一种为啮齿类，另一种为非啮齿类。前者一般用大鼠，后者常用狗，均要求雌雄各半。这样通过长期毒性实验，不但可提供长期反复用药的毒性反应特点，而且可获得有关动物种属和性别之间毒性反应有无差别的资料。

11.2.2.3 特殊毒性实验

11.2.2.3.1 局部刺激反应

体细胞制剂主要为细胞悬液，以不同的途径回输给机体时是否会对局部皮肤、静脉产生刺激反应是我们研究时需要考虑的问题，在进行有效性实验及体内致瘤性实验的过程中，可以同时观察经不同途径回输细胞制剂时，局部皮肤、黏膜及血管有无刺激反应发生，发生的严重程度如何。

11.2.2.3.2 致癌实验

1) 体外实验：软琼脂克隆形成实验

通常用克隆形成率来表示细胞活力，形成克隆的细胞必为贴壁和有增殖活力的细胞，因而克隆形成率反映了细胞的两个重要性状，即群体依赖性和增殖能力。随细胞生物学性状的不同，细胞克隆形成率差别很大，一般初代培养细胞弱，传代细胞系强；二倍体细胞弱，转化细胞系强；正常细胞弱，肿瘤细胞强。软琼脂培养是检测转化细胞和肿瘤细胞最为常用的方法，与细胞的恶性程度有很大的符合率(图 11.5)。具体实验方法如下：

用三重蒸馏水分别制备出 1.2%和 0.7%两个浓度的低熔点琼脂液，高压灭菌后，维持在 40℃，勿使其凝固；无菌制备出 2× DMEM(含 2×抗生素和 20%的小牛血清)，保存在 37℃中；按 1∶1 混合 1.2%的琼脂糖和 2×DMEM 后，取 3ml 混合液注入直径 6cm 平皿中(如为 10cm 平皿，则加 7~10ml)，作为底层琼脂，冷却凝固后置 CO_2 培养箱中备用；用培养基重悬待检测的细胞，使细胞悬液浓度为 5×10^6 个/ml；按 1∶1 比例将 0.7%琼脂和 2×DMEM 在无菌试管中混合以后，再向管中加入 0.2ml 的细胞悬液(细胞数 1×10^6 个)，充分混匀，注入已铺有 1.2%的琼脂糖底层平皿中(直径 6cm 平皿加 3ml，10cm 平皿加

7~10ml)，作为顶层琼脂，遂形成双琼脂层；待上层琼脂凝固后，置入 37℃、CO_2 培养箱中，培养 10~14 天；观察细胞集落形成情况。

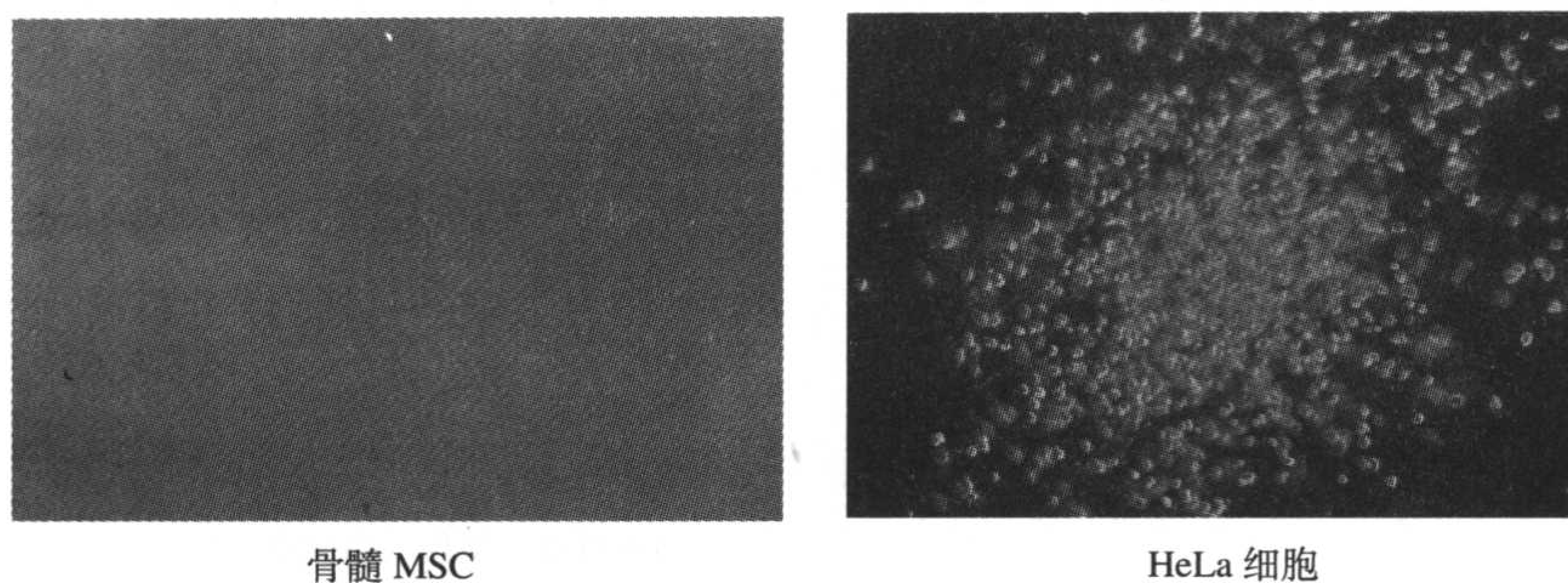


图 11.5　软琼脂克隆形成实验

2) 体内实验：裸鼠致瘤实验

在体外培养过程中细胞的癌变发展过程大致划分为启动、促进和发展三个阶段，这是一个多阶段连续发展的过程。在细胞受到致癌物处理后早期可观察到克隆形态和生长方式的明显改变。在继续传代的过程中，形态改变的细胞逃逸了衰老从而形成永生化，并发展成为锚着独立性生长能力的细胞，连续培养和增殖后注射到合适的宿主体内可以致瘤。致瘤性是将转化细胞接种到敏感动物体上，可获得形成肿瘤的能力。裸鼠具有以下特点：先天性胸腺缺损，胸腺依赖性免疫功能缺乏，T 细胞功能接近于零，但 B 细胞功能大致正常，异种移植时无排斥反应，是检测转化细胞致瘤性的良好的动物模型。具体方法如下：

取 SPF 级 BALB/c 胸腺缺陷裸鼠，4~6 周龄，体重 16g，取阳性对照 HeLa 细胞，待检测的体外诱导分化细胞按 5×10^7 个/0.2ml 接种裸鼠肋部皮下，用苦味酸标记，为期 2 个月观察肿瘤形成情况(图 11.6)。

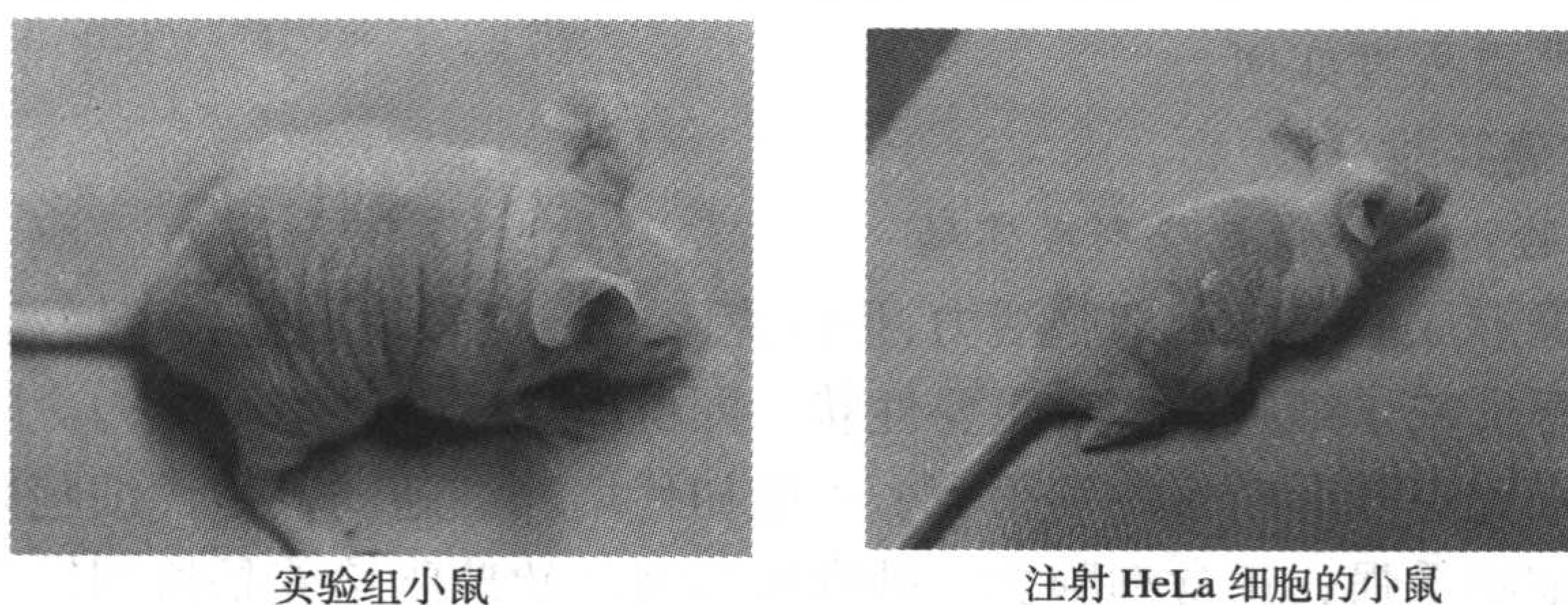


图 11.6　裸鼠成瘤实验结果

11.3　干细胞的采集、分离、鉴定及体外操作的质量控制

11.3.1　供体的检测项目及质量要求

必须指出细胞来源是属于自体、同种异体、异种还是细胞系，提供细胞的组织来源

及细胞类别的确证资料，其中包括形态生化或表面标志等。若细胞来源于同种异体，需说明供体的年龄、性别，供体必须符合国家对献血员的要求，并提供测试的方法及符合条件的依据。供体必须经过检验证明 HBV 抗原、抗 HCV、抗 HIV-1/2、梅毒抗体、细菌、霉菌检测结果均为阴性，必要时需说明供体的既往病史、家族史等临床资料。对于那些需通过激活体内免疫功能发挥作用或需细胞在体内长期存活的细胞治疗项目，除 ABO 血型外，还必须对供体做 HLA-I 类和 II 类分型检查，并证明与受体(患者)相匹配，同时提供检测方法和依据。

若细胞来源于动物，必须提供动物的来源、遗传背景、健康证明(如重要病原体，包括人畜共患疾病的病原体)、饲养条件、应用此类细胞的必要性和安全性。

若采用细胞系进行细胞治疗，应按国家相关规定进行主细胞库、种子细胞库及生产细胞库三级细胞库的建立及管理。应详细描述细胞的来源、鉴别标志、保存、预计使用寿命、在保存和复苏条件下稳定性的依据。生产细胞库不应含有可能的致癌因子，不应含有感染性外源因子，如细菌、霉菌、支原体及病毒。

11.3.2 干细胞采集、分离和体外处理过程中药品、试剂及耗材的检定制度

(1) 用于常规的检测试剂必须达到相应的国家法规和卫生部门的标准。应使用有国家或卫生部门颁发生产许可证的试剂。如果没有国家或卫生部门颁发生产许可证，应有充分的实验数据证明其可靠性符合要求，同时应有主管负责人的同意方可使用。

(2) 应在有效期内使用这些试剂，并按照制造商的规定量使用。

(3) 新启封的试剂在投入使用前应标明开瓶日期以及进行性能和效价的检测。

(4) 有污染迹象的试剂(浑浊或呈絮状)不能再使用。

(5) 各种药品、试剂和耗材应符合各自相应的质量标准。直接用于生产的金属玻璃器具，必须严格清洗或灭菌处理。

(6) 原料及辅料应符合现行《中国药典》或《中国生物制品主要原辅材料质控标准》或《一次性使用无菌医疗器械监督管理办法(暂行)》的要求。未纳入上述标准的化学试剂，应不低于分析纯。

11.3.3 干细胞采集、分离和体外处理过程中药品、试剂和耗材的质量检定标准

一切直接接触骨髓、脐带血或外周血等干细胞分离、采集的采集袋、骨髓穿刺针、离心管、无菌细胞培养液、培养用药品试剂、细胞悬液等材料，包括滴管、储存用具、培养瓶、离心管、一次性使用注射器等均应符合下述要求：

(1) 符合《中国生物制品主要原辅材料质控标准》规定的输血输液用塑料容器及输注塑料用具的质量标准。

(2) 符合国家药品食品监督管理局《一次性使用无菌医疗器械监督管理办法(暂行)》的规定。

(3) 液体的转移用自动高频热合机进行。

(4) 其生产厂家必须获得政府行政部门的《卫生许可证》及批准文号。

(5) 每一批号的产品尚需有国家药品生物制品检定所的热原质、毒性试验项目和无菌项目的检验报告。

(6) 使用时必须仔细检查小包装的密封性，穿刺针有无锈斑，注射器内有无杂质和污渍，衔接部位有无漏气(液)现象，包装上标示有批号、有效期、生产厂家。

11.3.4 细胞采集、分离及体外处理过程中用品与操作环境质量检定内容要点(表 11.6)

表 11.6 细胞采集、分离及体外处理过程中用品与操作环境质量检定内容要点

质控点	检定内容	检定频次数	检定者
采集袋、骨髓穿刺针 注射器等一次性塑料制品	外观包装、商标及标签	每次使用	使用者
细胞分离常用液体	外观包装、商标及标签	每次使用	使用者
抗凝剂	外观包装、商标及标签 抗凝剂含量、热原、无菌试验	每次使用 每批号	使用者 质控组
细胞处理	外观、细胞数、细胞活力、无菌试验	每份标本	制备组
培养瓶、离心管等一次性塑料制品	外观、包装、商标及标签	每次使用	使用者
细胞培养用血清	外观、包装、商标及标签效价	每次使用 每批号	使用者 质控组
GMP 实验室	尘埃粒子数 空气细菌霉菌培养 温度、湿度、洁净间之间压差，环境卫生、器具摆设 紫外线灯强度	每半年 每月一次 每天 每 3 个月	检测中心 质控组 使用者 质控中心
超净台	紫外灯强度 尘埃粒子数 空气细菌霉菌培养	每 3 个月 每半月 每月	质控中心 质控中心 质控组
低温离心机	洁净、运转情况 转速	每周 每半年	使用者 仪器公司
培养箱	温度、卫生、水盘	每天	使用者
冰箱	温度、卫生	每天	使用者
计量衡器	校准	每年	计量单位
培养液的制备			
微孔滤膜	发泡点试验	每张滤膜	质控组
过滤系统	灭菌、完整性	每次	质控组
过滤后的培养液	pH、澄明度、无菌试验、支持生长实验	每次	质控组

(王韫芳 闫 舫 裴雪涛)

主要参考文献

苗明三. 1997. 实验动物和动物实验技术. 北京：中国中医药出版社

Paxion G, Watson C. 1997. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd New York: Academic press, Inc.

第 12 章　干细胞治疗的临床(试验)研究

中国国家食品药品监督管理局(SFDA)于 1999 年 9 月 1 日发表并实施的《药品临床试验管理规范》对临床研究的定义为:“任何在人体(患者或健康自愿者身上)进行的药品的系统性研究，以证实或揭示研究药品的作用、不良反应及(或)研究药品的吸收、分布、代谢和排泄，目的是确定研究药品的疗效与安全性。”

干细胞的来源与种类、移植细胞数量、体外处理条件、移植治疗时机、植入途径、植入部位、疾病与病程的选择、观察时间与指标等因素均会影响到干细胞治疗的疗效和安全性。此外，干细胞植入与分化证据、植入环境间细胞的相互作用、细胞存活时间、老化问题、恶性转化风险等也同样为人们关注。因此，干细胞及(或)其体外处理的细胞作为一种细胞治疗措施或产品应用于临床时，必须对其进行系统的临床研究，以确认干细胞及(或)其体外处理的细胞对疾病的治疗效果与安全性。

12.1　临床研究的产生及筹划

临床研究通常起源于研究者。在完成了新的药物或治疗措施的大量实验室研究及临床前动物实验研究的基础上，研究人员往往将其中最有希望用于人体治疗的实验室结果推广到临床试验研究。通过临床试验研究可以获得有关新的治疗药物或措施的潜在风险、是否有效及作用的好坏等大量信息。综合上述信息并对其进行分析，得到的关于该药物或治疗措施的安全性和有效性评估是其进行药物生产申请的基础。

科学依据是进行一项临床研究的基础，只有证明其对于人体的可能的有效性和可行性后，才能进行临床研究。在进行临床研究前，无论研究规模大小、需要时间长短，都要先做详细计划，根据掌握的资料数据，准确计算样本含量、设计研究步骤、选取适当的指标并制定相应的评价标准，预计整个研究的期限及研究者的工作量、所需经费来源、数据分析能力以及受试者受益情况，对临床研究的整个流程进行整体考虑和分析后，评价其可行性及可能带来的经济效益和社会效益。

整个临床研究的初步流程如图 12.1 所示。

12.1.1　临床研究的目的

临床研究是要解决一个特定的临床问题，需要以客观科学方法找出答案，尽量避免主观偏倚的发生，因此首先应明确研究的重点，提出具体希望解决的问题；然后将问题用精确量化的语言表达，再结合研究方法的简述，使阅读者能够掌握研究的主要步骤及重点所在。因目的不同，临床研究分为治疗研究、预防研究、诊断性研究、筛查研究、生活质量研究等，大部分研究的目的不是单一的，往往为几个目的的结合，陈述研究目的时，需要准确、简洁，陈述的内容要能够反映研究的设计、资料数据的搜集和统计分

析方法、结论的取决等。

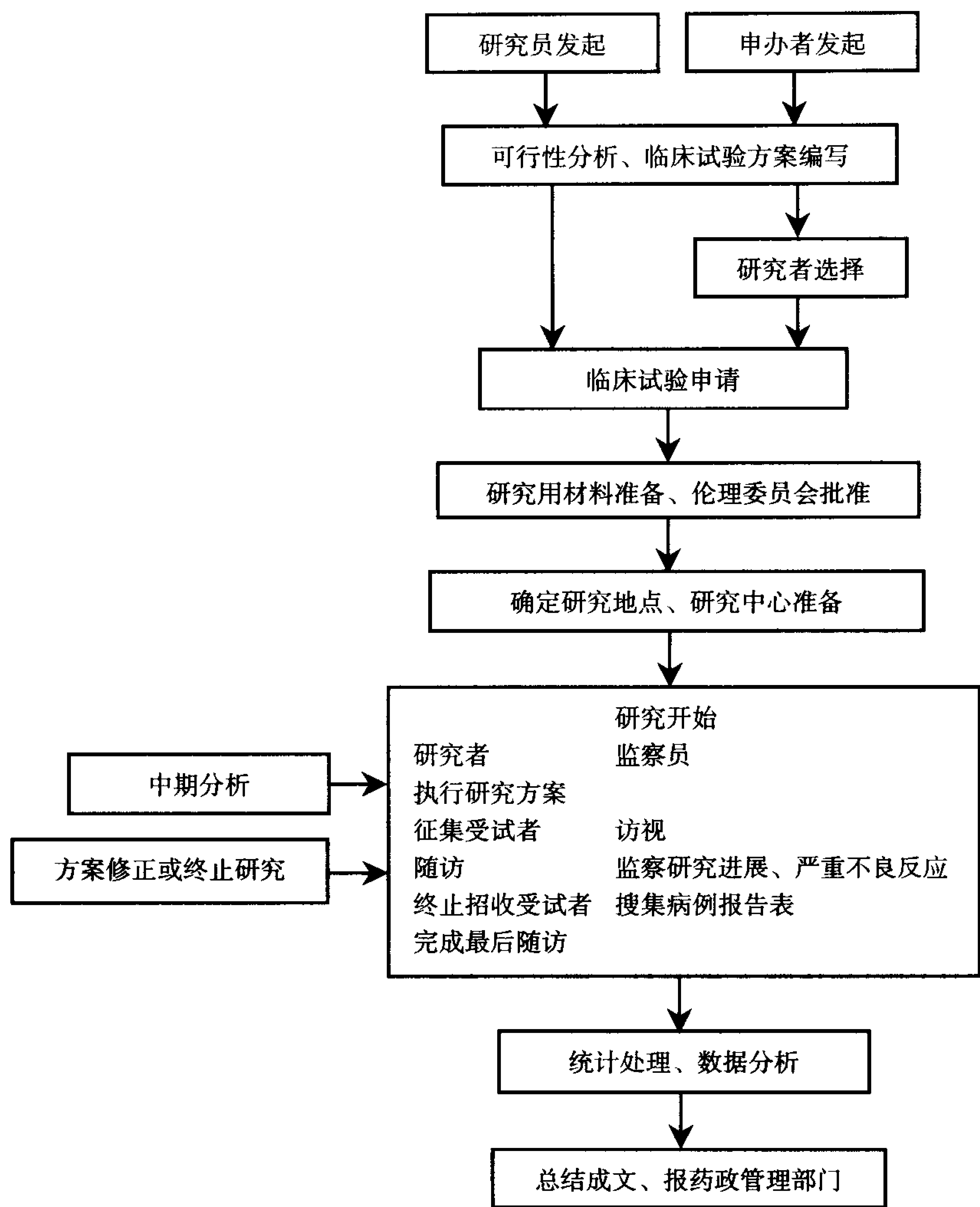


图 12.1 临床实验研究流程图

12.1.2 临床研究设计

临床研究设计首先考虑研究的问题是什么、评估的方法和相应的指标，合理安排将要进行的研究步骤和各项检测，将这些计划、设想、方案的纲目全部起草拟定，根据临床经验和搜集信息，同时对数据的误差做出比较准确估计，从而推断较为可靠的结论。一个周密、完善的设计包括简单、准确地量度重要临床指标，考虑必要措施，避免各种偏倚、误差、机遇因素等的产生或将其减少至最低程度。周密的设计可使研究准确按照方案进行，用较少的人力、物力，得到期望的可靠资料数据结果，顺利完成临床研究。

12.1.2.1 原则

临床研究设计的基本原则是随机、对照、盲法。

12.1.2.1.1 随机原则

随机化是选择典型样本的严格科学化过程，在筛选受试者后，按照随机数字表或者其他随机化的方法将受试者随机分配到不同的研究组中，这样可以消除选择偏倚，样本具有代表性。随机取样的优点是前瞻性，可减少误差、控制分布，数据具有高度科学价值。缺点是昂贵、费时，一般用于较大型研究，需要资助，并可能因此失去主导权，且偶然间的随机取样也可能存在机遇因素导致分布不均。

随机对照研究(randomization controlled trial，RCT)是指通过随机化分配，把研究对象分成研究组与对照组，使非研究因素在各组之间尽可能保持均衡，符合组间可比性，可以科学地评价研究结果。RCT 被认为是目前最佳的临床研究设计。

随机分组的种类包括：简单随机、区组随机及分层取样。简单随机是在整个研究中随机取样，根据随机方案将受试者分配入所需组别；区组随机是将受试者分成不同的区组，组中人数相同，然后再按简单随机方法将每个区组内的受试者分配到不同的研究组中；分层取样是在得知已知某些因素可能影响研究结果时，以这些因素作为分层条件，将入选病例分至不同的层中，在相同分布的层中再作简单或区组随机，以增强组间可比性。

12.1.2.1.2 对照原则

疾病的性质、严重程度在不同的机体间表现不同，并且机体之间存在着个体差异，这些都将对疾病的预后产生不同的影响，因此对照的设立，可排除不同因素造成的影响。常用的对照有安慰剂对照、空白对照、标准对照、自身对照、历史对照等。所谓的安慰剂是指一些外形与临床研究的药物类似/相同的，没有活性成分的“药物”，通常用于一般较轻的病症、慢性疾病及轻度神经官能症等。与安慰剂不同，标准对照通常是市面上治疗该适应证的标准用药，含有治疗作用的活性成分。自身对照是以同一患者为对象，比较治疗与不治疗(或不同治疗方法)的效果，受试者可先后接受两种或多种治疗，也可以同一时间，在身体两侧接受不同的治疗。对于罕见疾病或重病症，研究药物被认为是已知的最佳疗法，为了研究比较而给予患者安慰剂或较差治疗是不道德行为，只有选择相似的历史个案作为历史对照。

12.1.2.1.3 盲法原则

在设备良好的临床研究环境设置下，受试者感受到特别关注而影响其心理，表现良好效果；另一方面，研究员对自己感兴趣的研究对象较对照者特别关照和仔细，受试者的正面感受尤为强烈，此时，即使给予没有活性成分的安慰剂，就是“已经进行了治疗”这种行为也能产生良好疗效，改善疾病进程。为了减少选择偏倚和评估偏倚，有效增强客观评估结果，尤其需要受试者自我报告、自我评估，或研究者做主观评价时，非常有必要设盲。

“设盲”即将治疗组别保密，受试者、主要和其他协作研究人员、监察员、数据资料审查委员、统计学人员均可作为设盲对象。如表 12.1 所示，盲法大致有下列几种。

表 12.1 盲法和设盲对象

盲法	设盲对象		
	受试者	研究者	疗效评估研究员/数据分析员
单盲	√	×	×
双盲	√	√	×
三盲	√	√	√
第三者盲法	√	√	只有第三者(发药者)知悉疗法

12.1.2.2 常见临床研究设计

12.1.2.2.1 基本平行设计

将受试者编入不同治疗组别，数组同时进行研究，称为基本平行设计。最有效的统计比较是当各组例数和条件相同。优点是简单、同一时间可设两个或多个治疗组，如有受试者退出，也只失去一份数据而不影响整体研究结果。但是，若各组受试者特性不尽相同、基线有显著差别、预后因素分布不均时，组间比较便是在不公平条件下进行，影响研究结果的正确性。基本平行设计所需的样本数较大。

12.1.2.2.2 基本交叉设计

在基本交叉设计中，每个受试者先后接受研究中要比较的各个疗法。受试者在不同治疗阶段均要保持病情平稳，并在每个治疗阶段开始时保持一种相似的基线状态。通常又分为无间歇基线和有间歇基线交叉设计，间歇基线的目的是去除曾经使用的药物造成的影响，以免影响后续治疗的效果评估。间歇基线的长短取决于研究的治疗方法，一般不少于研究药物的 5 个半衰期。同时进行统计分析时，首先应确定有没有延续效应，如有则只能比较第一疗程的结果。优点是可做自身比较，即受试者自己与自己比较，排除因个体差异而导致对结果可靠性的影响，并且所需样本数量少，但受试者参与时间相对较长，容易影响受试者的依从性并导致失访，且早期退出研究相对较多。

12.1.3 研究对象

临床研究的目的是为了搜集人群的反应特性，记录在案，必要时反馈于总人群，但是“总人群”数目巨大，不可能一一记录每个个体的反应特性，常用抽样调查的方法从总人群中抽取样本进行研究，然后通过统计学方法将样本信息推论至总体，反映总体特性。临床研究中的研究对象即为针对某一特定人群随机抽取的样本。

12.1.3.1 样本含量确定

如何以最少的样本数得到最可靠、最有代表性的信息，从而能推论至总体，反映总体的特性，需要通过统计学方法的计算，用科学客观的方法来决定。

计算样本含量时需要一些数据设定，如预期总体均数(μ)和组间差异值(δ)。总体均数可以通过查阅资料，借鉴前人的经验或通过预试验找出参考值；差异值需要根据每一研究的性质及其相应的反应结果的主要指标、标准来设定；然后决定检验差异用的统计方法，选取相应的适当的统计学公式和工具表计算初步样本含量。

12.1.3.2 设定条件

1) 设定检验假设

根据研究目的，建立检验假设(无效假设)和选择假设，通常需要总体均数(处理效果)和标准差(抽样误差)的信息。有时总体参数的信息不易获得，可以根据有限数据而预测的期望值，或以临床上认为有意义的差值代替。

2) 研究设计

研究设计是决定计算公式的重要考虑条件之一，其他需要考虑的条件还有将要比较的组别数量和组别分配比率、数据类型、设定统计分析方法等。

3) 检验水准

试验允许的 I 型错误α,即当拒绝检验假设时,客观上检验假设却是正确的概率水平，通常取$\alpha = 0.05$。规定的α 水准越小，所需样本含量越大。

4) 期望检验效能、把握度

特定的α 水准下，若总体间确实存在着差异，该研究所能显示差异的概率即为检验效能，简单地说就是能够检出差异的把握度。检验效能越大，所需样本含量越大。检验效能由 II 型错误β的概率大小决定，即检验效能 $=(1-\beta)$。通常检验效能不能低于 0.75，否则检验的结果很可能不能反映总体间的真实差异，出现非真实的阴性结果。

5) 单侧和双侧检验

当检验目的为与标准用药相比，新制剂的疗效优于、相等或不弱于标准用药时，可采用单侧检验，当未设定何者更优时需采用双侧检验。当样本含量相同时，单侧检验比双侧检验准确有效。

12.1.3.3 常用方法

1) 序贯设计

序贯设计适用于难于征集受试者或所征集的例数非常少的项目或急性病，预先定下“停止标准和机制”，用特别设计图表做出不同样本容量下的差异显著界值，通过在整个研究进行期中，不断进行显著性检验，一旦得出显著性差异，即可停止研究。一般情况下，序贯研究设计所需的例数较定量设计样本例数少，可较快完成。但序贯设计通常需要征集配对受试者，配对因素也可能影响研究结果，并且结果的及时披露可能影响研究者对随后的研究执行和客观评估。

2) 定量样本

根据评定指标的性质、样本的分布情况、标准差的要求、检验水准及检验效能的不同，分别按照不同的计算公式计算样本含量。具体的计算公式及计算方法请参见医学统计学相关章节。

12.1.3.4 纳入/排除标准

对样本人群特性做一详细列表，选择相似基线的受试者，排除可能影响研究结果的因素，并符合适应证和研究药物的特性，使研究结果具有可比性，同时含有普遍特质，

以便将其推广至广大人群。

纳入/排除标准需考虑的因素主要包括：特定的治疗要求，如时间限制；药物的作用机制；伦理道德方面的考虑；受试者应具有一致性的特点，如相同的年龄、性别分布等；筛选检查结果在合理范围内，保障受试者安全；受试者具有相同疾病基线；受试者的自愿性和合作性；受试者的实际情况及是否曾/正参加其他研究等。

12.1.4 疗效指标

疗效指标是指测定研究结果的方法和尺度，是临床研究中评价疗效的标准，很多疾病均有其公认的疗效、反应指标。

12.1.4.1 指标选择条件

为了确保得到准确可靠的研究结果，指标的选择非常重要，应符合以下条件：

(1) 能够准确反映研究问题；

(2) 测定指标要明确、具体、前后一致；

(3) 尽量选择客观、准确性高的测量方法，避免主观因素造成的评估偏倚，同时测量结果应具有可重复性，且可操作性强；

(4) 定量指标优于定性指标；

(5) 选择敏感度高和稳定性强的准确测量方法；

(6) 根据研究目的、具体情况决定敏感度和特异性的高低，一般应选择诊断指数高、可用度高的测量方法。

12.1.4.2 指标标准分类

(1) 计数指标：有或无；是或否。

(2) 计量指标：可测量的指标如检验结果、分级或刻度的比例标准。

12.1.4.3 常用指标

(1) 症状治疗：使用一个百分比测量症状缓解时间、持续时间和明显程度；症状的发作次数、出现时间、每次持续时间。

(2) 治疗研究：使用一个百分比测量症状缓解、消失时间；不良反应的出现次数。

(3) 预防研究：疾病的首次出现时间，或症状消失后的复发时间、发作次数。

(4) 其他：各个症状或整体的主观评价；各种检测值的改变。

12.1.4.4 安全性指标

临床研究是要验证特定的研究目的，但大前提是严格确保受试者安全，在整个研究期均要密切监察安全性指标，如一般身体检查基线的改变，实验室检测值的改变，病情严重性或发作频率的改变以及不良反应的出现等。

12.1.5 研究流程

为了方便研究的执行和容易掌握进展程度，整个研究期划分为数个阶段，阶段的划分和各阶段时间长短主要取决于以下几个因素。首先应确保受试者安全，研究初期，随访较密，以监察其反应、耐受性及依从性；其次根据药物的作用期限及疗程的长短，适应证的特性以及受试者的依从性来进行研究阶段的划分。

一般治疗阶段分期如下：

(1) 筛选期：选择合适的受试者。

(2) 清药期：清除残留在受试者体内的药物，减少对本次临床研究的影响。

(3) 基线期：以后评估比较的相对基准。

(4) 治疗期：定期评价受试者反应，并获得准确的疗效/安全性信息。

(5) 治疗后期随访：检查治疗结束后的效果和反应，保证受试者安全。

12.1.6 知情同意书制定

知情同意书是每位受试者表示自愿参加某一试验的文件证明。研究者须向受试者说明试验性质、试验目的、可能的受益和危险、可供选用的其他治疗方法以及符合《赫尔辛基宣言》规定的受试者的权利和义务等，使受试者充分了解后表达其同意(中国国家食品药品监督管理局 1999)。

12.1.6.1 目的

知情同意书是在受试者参与一项临床实验前，让受试者了解临床实验的主要内容以决定是否参加的过程，同时也是在整个临床实验过程中为受试者提供信息的过程。为了让受试者决定是否参与某项临床研究，该研究中的医生及护士有责任为受试者解释实验的细节，并且需要用受试者日常使用的语言来解释。

12.1.6.2 知情同意书的主要内容

(1) 临床研究的目的和性质，相关临床研究的简要说明；

(2) 研究持续时间；

(3) 主要研究步骤，包括受试者入选/排除标准、给药方案、检测指标和检测频度、疗效评价标准、随访、复诊次数等；

(4) 受试者预期受益情况，可能获得的报酬及可能带来的社会效益；

(5) 临床研究中可能存在的风险和出现的不良反应；

(6) 对受试者的特殊要求，如研究期间妇女能否怀孕，研究期间需否避孕、采取何种避孕措施等；

(7) 临床研究中的联系人；

(8) 明确规定因参与研究而导致出现危害时的治疗责任和赔偿措施；

(9) 受试者声明自愿参加，并经充分考虑，如果拒绝参加将不会受到惩罚，知情同

意书不是合同，受试者可在任何时候退出临床研究，而不会受到歧视和报复，其医疗待遇于权益不受影响，并可获得其他治疗措施的继续治疗，并提供可以解答受试者权利问题和医学疑问的咨询人；

(10) 资料的保密性，受试者个人身份及资料不会被泄漏，研究结束后的公开文献中只有研究数据，伦理委员会、SFDA 或申办者代表在工作上需查阅受试者资料时，受试者同意让其按规定进行。

12.1.6.3 特别知情同意书

针对 I 期临床研究应制定特别知情同意书，因为 I 期临床研究的对象为健康自愿者，他们不需要治疗，也没有因此而受益，除了上述知情同意书的基本内容外，还应包括：自愿者的姓名、住址、联系电话、出现危急状况时需要通知的亲友姓名及电话号码，声明自愿参与。研究者应向其解释研究的目的、步骤、可能出现的危害，使受试者对研究有充分的了解，和研究者合作，披露一切自身健康状况及做出相应声明。

12.1.6.4 特别知情同意

基于道德原因，一般弱势群体，如儿童、孕妇或哺乳期妇女、精神病患者，如非必要或是特别的适应证对象、其他成年人无法取代，一般不招募为研究受试者。当受试者为儿童和精神病患者时，需由家长、合法代理人签署知情同意书。

12.1.6.5 签署知情同意书过程中需注意的问题

(1) 在进行任何有关研究的步骤及给予治疗前，要先取得受试者同意，并自愿签署参加研究。

(2) 研究者要用受试者所能接受的通俗易懂的语言向其解释上述知情同意书的详细内容。

a. 给予足够时间让受试者考虑，并亲自签名同意自愿参加研究。

b. 对没有能力表达同意的受试者，或受试者是文盲、无法书写者，应向受试者和其法定代理人提供上述资料和说明，并获得法定代理人的签名同意参加。

c. 如受试者和其法定代理人均无阅读能力时，整个知情过程应在独立见证人在场见证下进行，研究者向受试者/法定代理人详细解释，并获得其口头同意，由独立见证人签名见证。

d. 对无行为能力的受试者，如果伦理委员会书面同意，当研究者认为受试者参加研究符合受试者利益，则这些受试者也可参加研究，同时应当由其法定代理人签署同意。

e. 如果受试者无行为能力、见证人或法定代理人签名的知情同意书也无法取得，但在危急情况下，研究者认为参与研究是符合受试者最佳利益，可暂时豁免签署知情同意书，但必须由研究者将不能取得签署同意的详细理由记录在案并签名。当过了危急期，应尽快通知受试者并取得同意，签署知情同意书，如受试者不同意，应按其意愿退出。此方案须先经伦理委员会同意。

(3) 上述所有方法和表格均需经过伦理委员会批准方可采用，所有亲笔签署均应同

时亲笔注明日期。

(4) 提供复印本给受试者。

(5) 签署的同意书(包括修正同意书)必须与病例报告表或原始资料一起存放至研究结束后 5 年。

(6) 研究期间，若方案有任何修正，知情同意书也应做相应更新，修正的方案、知情同意书经伦理委员会批准后，仍在研究期中的受试者需重新在修正知情同意书上签署同意，新旧两份同意书一起保存。

12.1.7 病例报告表

每个进入研究的受试者均有一个独立的受试者编号和一本与该受试者编号相同的病例报告表(case report form，CRF)。病例报告表是由研究项目主管/监察员、统计学家、数据处理主管和医疗法规人员共同编撰，依据研究方案中的研究步骤流程，在临床研究过程中，用以记录方案中要求的资料数据的表格。内容包括研究方案、管理和官方规定的信息、可以追溯受试者身份的代号或编码、治疗处理、受试者接受治疗前后和治疗前的情况、依从性、检验室数据、不良反应、严重不良反应、早期退出及原因等。从病例报告表中获得的数据是评估药物安全性和有效性的依据，也是核实数据真实性和正确性的重要文件，研究的完整性取决于病例报告表中资料的真实和正确。

12.1.8 不良反应事件与严重不良反应

12.1.8.1 不良反应事件

新药临床开发、期间发生的任何不良医疗事件，不论是否与研究药物有关，不论怎样轻微，均应提高警觉，记录为不良反应事件(adverse event，AE)，至开发期结束，把所有从临床研究搜集得来的不良反应信息结合、分类、总结成安全报告，呈交药物注册申请。常见的不良反应事件包括以下情况。

(1) 受试者签署知情同意书后、给予研究药物前发生的事件；

(2) 知情同意书签署后的断症，即使在此之前就存在的事件；

(3) 在给予研究药物前没有发生的事件；

(4) 受试者接受研究药物后发生的任何不良医疗事件，不论是否与治疗有相互关系；

(5) 出现不良的和意料之外的症状(包括发现某一实验室检验指标异常)；

(6) 某些疾病、症状暂时与研究药物的使用有关；

(7) 入选前已经存在的事件，入选时未出现，给予研究药物后复现；

(8) 入选时已经存在的事件，但在入选后加重，或事件重现的频率和严重性增加。

12.1.8.2 严重不良事件

严重不良事件(serious adverse event，SAE)指在临床试验过程中发生需住院治疗、延长住院时间、伤残、影响工作能力、危及生命或死亡、导致先天畸形等事件(李金恒等 2000)。对于严重不良事件应迅速准确进行报告，以便使药物安全监察部门能够及时采取

相应措施，保障受试者和其他广大参与研究的自愿者的安全。临床研究中，严重不良事件的报告时限为研究员知悉严重不良事件发生后的24h之内，研究者应立即通知伦理委员会和申办者/监察员，同时研究者/申办者有责任向地方药品监督管理局呈报。国家卫生部1999年11月颁布的不良反应事件报告时限为：已注册上市销售的产品，在注册后头5年内，每3个月向地方药物不良反应监测机构报告发生的任何不良反应事件，发生严重不良反应事件应在15个工作日内报告；注册5年后，在15个工作日内报告发生的严重不良反应事件。不良反应事件报告要求及报告的程序、方法请参见国家药物不良反应监测中心网站www.cdr.gov.cn。

12.1.9 数据搜集、处理和统计分析

通常在临床研究进行前，对整个研究的数据分析方法已经选定，并编制相应的统计数据库。当所有的受试者按照临床研究方案的计划完成随访，完成整个病例报告表的填写后，由监察员收集原件送至数据处理组。数据处理组先由人工进行数据资料复核，确认无误后输入计算机，进行编码，彻底检查复核后冻结数据库，根据预先选定的统计方法进行数据分析。当出现与期望不一致的分析结果时，应仔细总结分析结果的真实性，并对导致此结果的可能原因进行讨论，提出建议。根据临床研究中获得的信息，经过数据整理、统计分析后将其形成研究总结报告。

12.2 临床研究的不同阶段

根据研究目的的不同，人体临床试验研究分为四期，依次顺序进行，也可在同一时间内两期同时开展。

12.2.1 I期临床研究

I期临床试验(phase I clinical trial)是初步的临床药理学及人体安全性评价试验，为新药人体试验的起始期，又称为早期人体试验(李金恒 2000)。I 期临床试验包括耐受性试验和药代动力学研究，一般在健康受试者中进行。其目的是研究人体对药物的耐受程度，并通过药物代谢动力学研究，了解药物在人体内的吸收、分布、消除的规律，为制定给药方案提供依据，以便进一步进行治疗试验。I期临床试验通常在小范围人群(20~30例)中进行，应选择健康成年人(经过体格检查，无严重的心脏、肝脏、肾脏、造血功能障碍者)及少数适宜的患者，均以自愿为原则，男女数量最好相等(临床药代动力学研究常选择男性)。

12.2.1.1 检查项目

目前尚无统一标准。但至少应包括下列各项：体格检查方面，身高、体重不超常，无阳性体征发现，如心脏、肺听诊及血压正常，胸、腹部叩、触诊无异常发现，无明显的皮下淋巴结肿大等；实验室检查项目包括血、尿常规；血液生化检查包括胆红素、转

氨酶、血浆蛋白质、血糖、肌酐、尿素氮等；心电图检查等。上述检查结果均应在正常范围内，此外还应询问受试者的既往病史、用药史。

12.2.1.2 受试者排除标准

不应入选的受试者包括：

(1) 健康检查不符合受试者标准；

(2) 经常用药、嗜烟酒，4 周内参加过其他临床试验；

(3) 3 个月内用过已知对某脏器有损害的药物或目前正在使用药物者；

(4) 有药物过敏史；

(5) 试验前患过重病；

(6) 有胃肠或肝、肾病史或现有上述疾病；

(7) 有其他影响吸收、分布、代谢和排泄的因素。

12.2.2 II 期临床研究

在一个较大范围人群(100~300 例)中进行新药或新的治疗措施的试验研究，以观察其有效性并进一步评价其安全性。应严格挑选没有其他疾病、只患有确立的适应证的患者，以避免其他疾病因素对疗效评价的影响。II 期临床研究的目的是在最大耐受剂量范围内，找出具有最佳疗效，同时没有或有可接受的不良反应的相应剂量范围，进一步确定最佳治疗剂量，并评价其治疗效果。

12.2.3 III 期临床研究

进行临床研究的新药或新的治疗措施实施的人群扩大到 1000~3000 人，以确证其有效性，监控副反应的发生，与常用的治疗措施进行比较，收集信息以便更安全地应用新药或新的治疗措施。III 期试验的意义是显示药物的生物活性和临床功效，需要尽可能地将其与安慰剂组或未经治疗组做对比。

12.2.4 IV 期临床研究

通常是指对已获得市场注册的药物的临床研究，也常被称作“上市研究”或“经验研究”，它涵盖很多注册后的研究项目。医药经营部门为了鼓励医生使用新药而推行的“推广研究”或“观察研究”，并不是严格意义上的临床研究。有时 IV 期研究的概念也与上市后药品的监测，即对已上市药物的安全性监察相混淆。事实上 IV 期研究是监察程序的一部分，但其目的除了包括确定安全性以外，还包括研究功效或有效性等(陈志刚 2000)。

IV 期临床研究的意义是扩展对新药疗效的了解，并且确保药物在常规临床应用中对广泛人群的安全性。药物的疗效在 I~III 期临床研究中已经通过经严格选择的人群表现出来了，但药品被投放市场后，其在广泛人群中的疗效仍然是未知的，得出的结论不能直接地推广到一般人群。IV 期临床试验中受试者为广泛人群，包括注册前临床研究通常排

除的老年受试者，因而它更能贴切地反映实际的临床情况。

IV 期临床研究的意义是描述药物的有效性，因此研究的第 2 个目的是考察新上市药品与其他治疗方法相比有何优点。IV 期研究的第 3 个目的是针对药品注册前因样本量小和时间所限未能考察和解决的假说和问题进行研究，内容包括药物长期效果和毒性、药物次要作用、具体的给药方案(如剂量)、药物相互作用、联合用药或辅助治疗的影响等。IV 期研究更重要的目的是将一种新药推广到常规的临床工作中。这种举措不仅具有商业性，还有严密的科学性和伦理基础。

IV 期研究提供的药物安全性方面的详细资料，是在合理的控制和严密的监视下进行的，它比经其他任何诸如自发性的药物不良反应(ADR)报告——黄卡、病例报告、文献等途径获得的资料更可靠。IV 期研究的重点在于发现不可预见的 ADR，而不是可预见的 ADR、不严重的 ADR 或临床意义不大的异常临床检验指标。表 12.2 是不同类型研究的主要内容。

表 12.2　不同类型研究的主要内容

	主要内容	研究类型
活性	药物对靶系统的生物活性	临床前研究和早期临床试验(I，II 期)
疗效	药物对特定患者的临床疗效	临床试验(II，III 期)
有效性	药物在人群中的总体疗效	后期临床试验(IV 期)
效率	在公共保健系统中的药物的成本-效果比	药物经济学研究

12.3　干细胞治疗的临床新技术申请

为了保证干细胞及其细胞工程产品安全合理的使用，许多研究机构制定了相关的规程。如美国 FDA 将干细胞的处理分为只对细胞进行分离、冻存等简单操作的“初处理”(minimal manipulation)和经过扩增、包装、活化、基因修饰等较复杂的加工，可能改变细胞原有生物学特性的“进一步处理”(more than minimal manipulation)两类，对后者要求进行包括化学、生物学、操作的对照研究，及进入市场前的安全性和有效性的确定。临床应用(包括临床试验)的干细胞及其细胞工程产品的处理必须严格按照现行 GMP(包括对操作、质控、仪器设备及工作人员的要求)标准进行。对于仅经过初处理的细胞的临床应用，应该按照特殊医疗技术进行临床新技术的申请。

12.3.1　申请范围

特殊医疗技术是指可能对人体健康和医疗安全、医疗质量和医疗水平、社会伦理道德或生态环境、现有医疗技术产生重大影响的诊断和治疗技术项目。范围包括：

(1) 可能对现有医疗技术产生重大影响的，如生物基因诊断与治疗技术(克隆技术、组织、细胞工程技术等)、组织器官移植技术(干细胞移植，心脏、肺、肝脏、胰、肾脏等重大器官移植)等；

(2) 可能对人体健康或生态环境产生重大影响的(致死、致残或造成重要器官严重功能损害、严重环境污染等)，如利用射线进行治疗(立体定向放射手术、质子治疗等)等；

(3) 可能对社会伦理道德产生重大影响的，如变性手术、人类辅助生殖技术等；
(4) 远期医疗后果不能明确的；
(5) 其他特殊医疗技术。

12.3.2 临床新技术申请程序

新技术申请程序如图 12.2 所示。

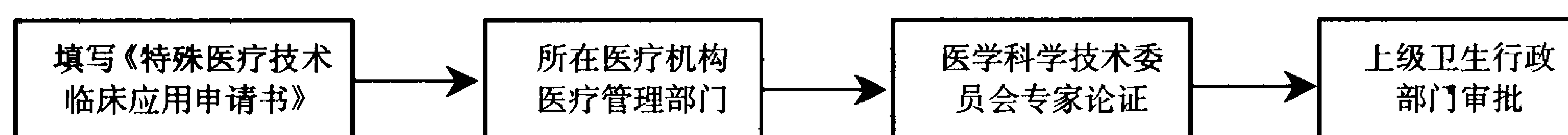


图 12.2 临床新技术申请程序

12.3.3 必须具备的申请条件

12.3.3.1 医疗机构

(1) 具备实施该技术项目必要的技术队伍；
(2) 具备实施该技术项目必要的高精尖医疗设备和设施；
(3) 具备实施该技术项目必要的经费投人。

12.3.3.2 项目负责人

(1) 高级专业技术职务；
(2) 熟练掌握该项目技术；
(3) 符合实施该技术项目对身体条件的要求。

12.3.4 申请所需提交材料

(1)《特殊医疗技术临床应用申请书》。
(2) 医疗机构医学科学技术委员会、医学伦理委员会出具的意见书。
(3) 特殊医疗技术项目有关信息、文献、综述等资料。

其中综述资料包括：临床新技术申请的立题依据及目的，特殊医疗技术中应用细胞的采集、分离与处理过程的方法及相应的质控标准，临床前安全性及有效性实验研究，具体临床研究方案等。

12.3.5 专家论证、评估内容

(1) 医疗技术的安全性、有效性、先进性、经济效益、可能对社会伦理道德、现有医疗技术、人体健康和环境产生的影响；
(2) 国内外研究开展情况；

(3) 是否具备开展该医疗技术所必需的技术力量、设施设备、实验室技术水平和技术操作规程。

12.3.6 临床试验研究的开展与推广

12.4 干细胞相关的临床试验研究示例

肢体缺血性疾病是我国乃至世界范围内的常见病、难治病，随着我国老年人口的增多，发病有逐渐增多的趋势。这类疾病的发病率西方国家报道在 55 岁以上的成年人中高达 15%，其中 1/3 以上表现有典型的间歇性跛行症状，在我国占全国总人口的 3.4%~12.1%。目前尚无任何药物治疗能对严重缺血的自然病程产生积极的作用，外科人工血管搭桥术仅能使部分患者病情得到缓解，并且远期疗效也不满意，尽管截肢术有其自身的不足，会带来一系列的并发症，但仍常被用以解决患者的严重症状，尤其是不堪忍受的缺血性静息痛，虽然术后可安装义肢及进行康复治疗，但患肢的活动功能并不能完全恢复；另外此类患者大多是高龄患者，身体难以承受搭桥手术的打击，而介入治疗还受很多限制，所以迫切需要寻求一种新的有效的治疗方法。

动物实验表明，将犬的自体骨髓全血植入其腹主动脉人工血管模型后发现，经标记的骨髓细胞参与了人工血管的内皮化形成。在骨髓细胞移植治疗肢体缺血的研究中发现，功能性的内皮祖细胞(EPC)发源于骨髓内的单个核细胞(BM-MNC)中，MNC 中的 CD34 阳性细胞大多为 EPC，CD34 阴性细胞则可合成 VEGF、bFGF 和单核细胞趋化蛋白(MCP-1)等促进 EPC 的扩增分化，还可合成 Ang-1 促进并维持新生血管的成熟。同时，自体骨髓来源方便，采集过程相对简单，技术比较成熟，一般患者均能耐受。与外周血和脐带血来源的单个核细胞相比，骨髓来源的单个核细胞不仅能提供更多的内皮祖细胞，而且可以分泌一些血管再生因子，可促进内皮细胞的增殖。并且患者自体骨髓来源的细胞，无排斥反应发生，不涉及如胚胎干细胞样的伦理问题，因而也不会引起社会和法律方面的争议。应用干细胞再生血管促进缺血部位血管新生，无论是动物实验还是一些初步的临床试验性研究，均证明了该技术的安全性和有效性，因此备受科研和临床医务工作者的青睐。下面我们以自体骨髓单个核细胞治疗肢体缺血性疾病的临床新技术申请为例，说明如何进行干细胞相关的临床试验研究。

附　自体骨髓单个核细胞治疗肢体缺血性疾病的临床试验方案

1　目的

观察自体骨髓单个核细胞治疗肢体缺血性疾病的安全性和疗效，按照标准化、规范化的临床试验方案评估治疗效果。

2　试验设计

2.1　随机开放性的治疗研究

2.2　试验对象为肢体缺血性疾病患者

2.3　治疗方案

2.3.1　治疗前准备

治疗抽取患者外周静脉血进行生化指标检测及相关病毒检测，并留存无污染血清1ml，冻存于-20℃冰箱。

2.3.2 确定缺血动脉的范围

2.3.3 确定所需的细胞数量

2.3.4 确定所需的骨髓数量

根据计算的单个核细胞数量推算所需的骨髓数量。

2.3.5 自体骨髓的抽取及质量要求

2.3.6 自体骨髓单个核细胞的分离、处理及质量控制

2.3.6.1 骨髓单个核细胞的分离

2.3.6.2 骨髓单个核细胞的体外预培养

2.3.6.3 骨髓单个核细胞的检定

(1) 得率；

(2) 数量及存活率；

(3) 细胞形态检查；

(4) 无菌试验。

2.3.7 保存、运输及有效期

细胞悬浮于生理盐水中，4~8℃下保存，有效期为6h。

2.3.8 骨髓细胞移植操作规程

(1) 移植方法：肢体缺血肌肉局部注射移植法。

(2) 植入骨髓细胞量及骨髓细胞悬液体积：从骨髓血中分离出自体骨髓单个核细胞，根据移植的点数用相应体积的生理盐水制成细胞悬液，植入患肢局部缺血部位。

2.4 治疗结束后随访12个月

3 方案实施

3.1 适应证

肢体缺血患者，包括：

(1) 有间歇跛行且静息状态下踝肱指数(*ABI*)<0.6~0.8；或已有静息痛、溃疡、坏疽。

(2) 保守治疗无好转且影像学检查病变血管无流出道，不适合外科搭桥手术。

(3) 尽管有较好的流出道动脉，但患者年老体弱，无法耐受手术。

3.2 禁忌证

(1) 血糖控制不理想的糖尿病患者[HbA1c>7%和(或)增生性视网膜病变]。

(2) 过去5年内明确有恶性疾病的患者及血中肿瘤标记物水平明显升高者。

(3) 严重心脏、肝脏、肾肺功能衰竭或一般状况很差不能耐受骨髓采集和移植手术者。

3.3 筛选期

3.3.1 凡符合入选标准，并经排除标准筛选的患者，即可通过本试验的筛选期

3.3.1.1 入选标准

肢体缺血患者(如下肢动脉硬化性闭塞症、糖尿病肢体缺血、血栓闭塞性脉管炎等)：

(1) 有间歇跛行且静息状态下踝肱指数(*ABI*)<0.6~0.8，或已有静息痛、溃疡、坏疽；

(2) 保守治疗无好转且影像学检查病变血管无流出道，不适合外科搭桥手术；

(3) 尽管有较好的流出道动脉，但患者年老体弱，无法耐受手术；

(4) 年龄、性别不限；

(5) 无主要器官的功能障碍，血常规、肝脏、肾脏功能及心脏功能基本正常者；

(6) 患者无精神疾病及语言功能障碍，能理解本研究的情况并已签署知情同意书者。

3.3.1.2 排除标准

(1) 不符合以上入选标准者；

(2) 不能签署知情同意书，不能遵守本研究的约定时间表者；

(3) 有理由怀疑患者被强迫加入本试验；

(4) 妊娠患者；

(5) 血糖控制不理想的糖尿病患者[HbA1c>7%和(或)增生性视网膜病变]；

(6) 过去 5 年内明确有恶性疾病的患者及血中肿瘤标记物水平明显升高者；

(7) 严重心脏、肝脏、肾、肺功能衰竭或一般状况很差不能耐受骨髓采集和移植手术者。

3.3.2 需检测以下项目

3.3.2.1 化验检查

3.3.2.1.1 病毒指标：HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe

3.3.2.1.2 血生化：ALT、AST、ALB、胆红素、血糖、肌酐

3.3.2.1.3 血常规、尿常规

3.3.2.1.4 凝血酶原时间

3.3.2.1.5 肿瘤标志物

3.3.2.1.6 已婚育龄妇女做尿妊娠试验

3.3.2.2 心肺功能检查

3.3.2.3 专科检查

3.3.2.3.1 皮肤颜色和温度、足背动脉搏动、踝部血压测定

3.3.2.3.2 四肢关节运动、姿势、步态、畸形、疼痛情况

3.3.2.3.3 溃疡与坏疽的部位、性质和程度

3.3.2.3.4 创面肉芽生长情况、窦道及分泌物情况

3.3.2.4 肢体 X 射线照片

3.3.2.5 动脉造影：病变血管范围、程度、侧支循环情况

3.3.2.6 血流动力学：多普勒超声检查；踝/肱指数；经皮氧分压

3.4 治疗期

见治疗方案。

3.5 随访观察期

见试验随访观察日历表。

4 疗效评判标准

4.1 测定静息状态下踝肱指数(*ABI*)

通过多普勒血流仪评价肢体周围血管病变的程度，检测干细胞移植治疗前后的踝肱指数及血流分析(*ABI* 正常值>1.0，当增长>0.1 时即为有所改善)。

ABI<0.4：提示严重下肢动脉梗阻

ABI<0.7：提示中度下肢动脉梗阻

ABI<0.9：提示轻度下肢动脉梗阻

4.2 经皮氧分压测定 $TcPO_2$(mmHg)

经皮氧分压测定 $TcPO_2$ 直接评价肢体组织缺氧程度，进而评价肢体血流供应状况，用于评估干细胞移植治疗慢性肢体缺血性疾病的治疗效果(正常值>60mmHg)。

4.3 动脉数字减影血管造影(IA-DSA)，观察侧枝血管形成情况

通过 DSA 观察移植前后新的侧枝血管形成情况，评价分级：

+0 无侧枝血管形成

+1 有少许侧枝血管形成

+2 有中量侧枝血管形成

+3 有丰富的侧枝血管形成

4.4 无痛性步行时间(PWT)(分)或跛行距离(m)的测定

按正常速度(60~70m/min)步行。

0 分 行走≥500m，无疼痛

1 分 行走 400~499m，有疼痛

2 分 行走 300~399m，有疼痛

3 分 行走 100~299m，有疼痛

4 分 静息痛，无法行走或行走小于 100m，有疼痛

4.5 疼痛评分标准

0 分 无疼痛

1 分 偶有疼痛，被问时能回忆起

2 分 疼痛经常出现但能耐受，不需或偶用一般止痛剂难以缓解

3 分 经常用一般止痛剂

4 分 因疼痛影响睡眠，一般止痛剂难以缓解

4.6 患肢冷感评分标准

0 分 无冷感

1 分 患者偶诉受累肢体有发凉、怕冷的感觉

2 分 受累肢体经常有发凉、怕冷的感觉

3 分 受累肢体有明显的冷、凉感觉，需采用局部保温措施，症状能得到一定程度的缓解

4 分 受累肢体有明显的冷、凉感觉，采用局部保温措施，症状亦无明显改善

4.7 溃疡和坏疽分级标准

0 级 有发生足溃疡危险因素的足，目前无溃疡(表现为神经性溃疡)

1 级 表面溃疡，临床上无感染

2 级 较深的溃疡，常合并软组织炎，无脓肿或骨的感染

3 级 深度感染，伴有骨组织病变或脓肿

4 级 局限性坏疽(趾、足跟或前足背)

5 级 全足坏疽

5 风险(不良反应)的预测及应采取的措施

5.1 风险预测

5.1.1　无严重的不良反应

5.1.2　其他不良反应

(1) 皮肤过敏反应：有皮疹、荨麻疹、面部水肿等；

(2) 骨骼肌肉系统：足背或肌肉注射部位胀痛；

(3) 移植后血清磷酸激酶浓度一过性升高，但最大值低于5.3倍，且7天内恢复到正常水平；

(4) 其他：偶有发热、头痛、疲劳等反应。

5.2　处理方法

(1) 在试验的执行期间，对所有的副作用需按照GCP程序进行监测、记录和报告。

(2) 对一般不良反应，如发热、寒战、头痛、恶心、乏力、腹胀、肌痛、关节痛、轻微皮疹、局部反应等通常采取对症、支持治疗。

6　临床试验观察表及受试者入选表

自体骨髓单个核细胞治疗肢体缺血性疾病临床试验观察表

项目			治疗前	治疗当日	随访					
					第1周	第2周	第4周	3个月	6个月	12个月
入选筛查			○							
知情同意			○							
受试者随机入组			○							
采集病史			○							
观察项目	生命体征		○	○	○	○	○	○	○	○
观察项目	体格检查		○	○	○	○	○	○	○	○
观察项目	理化检查	血常规	○	○		○	○		○	○
观察项目	理化检查	血生化	○	○		○	○		○	○
观察项目	理化检查	尿常规	○	○		○	○		○	○
观察项目	专科情况	静息痛	○	○	○	○	○	○	○	○
观察项目	专科情况	皮肤颜色	○	○	○	○	○	○	○	○
观察项目	专科情况	皮肤温度	○	○	○	○	○	○	○	○
观察项目	专科情况	溃疡	○	○	○	○	○	○	○	○
观察项目	专科情况	坏疽	○	○	○	○	○	○	○	○
观察项目	专科情况	*ABI*指数	○			○	○	○	○	○
观察项目	专科情况	$TcPO_2$	○		○	○	○	○	○	○
观察项目	专科情况	DSA	○						○	○
观察项目	专科情况	PWT	○		○	○	○	○	○	○
观察项目	不良反应及事件记录			○	○	○	○	○	○	○
观察项目	辅助治疗用药记录			○	○	○	○	○	○	○

受试者入选表

入选标准	是	否
肢体缺血患者(如下肢动脉硬化性闭塞症、糖尿病肢体缺血、血栓闭塞性脉管炎等)		
1. 有间歇跛行且静息状态下踝肱指数(*ABI*)<0.6~0.8；或已有静息痛、溃疡、坏疽		
2. 保守治疗无好转且影像学检查病变血管无流出道，不适合外科搭桥手术		
3. 尽管有较好的流出道动脉，但患者年老体弱，无法耐受手术		
4. 年龄、性别不限		
5. 无主要器官的功能障碍，血常规、肝脏、肾脏功能及心脏功能基本正常者		
6. 患者无精神疾病及语言功能障碍，能理解本研究的情况并已签署知情同意书者		

请在符合的标准上画“√”，并确认，上述标准均应为“是”，才能入选。

排除标准	是	否
1. 不符合以上入选标准者		
2. 不能签署知情同意书，不能遵守本研究的约定时间表者		
3. 有理由怀疑患者被强迫加入本试验		
4. 妊娠患者		
5. 血糖控制不理想的糖尿病患者[HbA1c>7%和(或)增生性视网膜病变]		
6. 过去5年内明确有恶性疾病的患者及血中肿瘤标记物水平明显升高者		
7. 严重心脏、肝脏、肾、肺功能衰竭或一般状况很差不能耐受骨髓采集和移植手术者		

如不符合上述标准，请在“否”项下画“√”，并确认，上述标准均应为“否”，才能入选。

(闫 舫 王榅芳 裴雪涛)

主要参考文献

陈志刚，甄健存. 2000. 国外IV期临床研究. 中国新药杂志, 9(6):383~385

李金恒，刘玉秀，洪立基. 2000. 新药临床试验的原理与操作(4). 中国新药杂志, 9(6):380~382

中国国家食品药品监督管理局. 1999. 药品临床试验管理规范. http://www.sda.gov.cn/cmsweb/webportal

第 13 章　干细胞与基因治疗

基因治疗是指通过调控目的基因的表达，在基因水平上抑制、替代或补充缺陷基因，从而恢复细胞、组织和器官的生理功能。基因治疗有体内(*in vivo*)和体外(*ex vivo*)两种途径。将目的基因在体内直接导入靶细胞从而起到治疗效果的方法为体内途径，而体外方法是由患者体内取出某一器官或组织的细胞，体外扩增后，将目的基因转入其中，建成表达外源基因的遗传修饰细胞，扩增培养后，以一定数量回植体内，达到治疗目的。目前的基因治疗策略以体外方法较多。选择合适的运载细胞将治疗基因携带到治疗位置并发挥作用是治疗成功与否的重要因素。由于干细胞不仅具有自我复制更新能力，有利于基因长期稳定的表达，而且取材容易，易于体外培养并植回患者体内，近年来干细胞作为基因治疗的靶细胞得到了更多的研究，其中一些治疗方案已经进入临床试验阶段。下面将这一领域试验技术、临床应用现状做一介绍。

13.1　基因治疗概述

13.1.1　概述

基因治疗(gene therapy)的概念简单地说就是用正常或野生型(wild type)基因校正或置换致病基因的一种治疗方法。在这种治疗方法中，目的基因被导入到靶细胞(target cell)内，它们或与宿主细胞(host cell)染色体整合成为宿主遗传物质的一部分，或不与染色体整合而位于染色体外，但都能在细胞中得到表达，起到治疗疾病的作用。目前基因治疗的概念扩大了，凡是采用分子生物学的方法和原理，在核酸水平上开展的疾病治疗方法都可称为基因治疗。随着对疾病本质的深入了解和新的分子生物学方法的不断涌现，基因治疗方法有了较大的发展。根据所采用的方法不同，基因治疗的策略大致可分为以下几种：

(1) 基因置换(gene replacement)。基因置换就是用正常的基因原位替换病变细胞内的致病基因，使细胞内的 DNA 完全恢复正常状态。这种治疗方法最为理想，但目前由于技术原因尚难达到。

(2) 基因修复(gene correction)。是指将致病基因的突变碱基序列纠正，而正常部分予以保留。这种基因治疗方式最后也能使致病基因得到完全恢复，操作上要求高，实践中有一定难度。

(3) 基因修饰(gene augmentation)。又称基因增补，将目的基因导入病变细胞或其他细胞，目的基因的表达产物能修饰缺陷细胞的功能或使原有的某些功能得以加强。在这种治疗方法中，缺陷基因仍然存在于细胞内，目前基因治疗多采用这种方式。如将组织型纤溶酶原激活剂的基因导入血管内皮细胞并得以表达后，防止经皮冠状动脉成形术诱发的血栓形成。

(4) 基因失活(gene inactivation)。利用反义技术能特异地封闭基因表达特性，抑制一些有害基因的表达，以达到治疗疾病的目的。如利用反义 RNA、核酶或肽核酸等抑制一些癌基因的表达，抑制肿瘤细胞的增殖，诱导肿瘤细胞的分化。用此技术还可封闭肿瘤细胞的耐药基因的表达，增加化疗效果。

(5) 免疫调节(immune adjustment)。将抗体、抗原或细胞因子的基因导入患者体内，改变机体免疫状态，达到预防和治疗疾病的目的。如将白细胞介素-2 导入肿瘤患者体内，提高患者 IL-2 的水平，激活体内免疫系统的抗肿瘤活性，达到防治肿瘤复发的目的。

(6) 其他，增加肿瘤细胞对放疗或化疗的敏感性，采用给予前体药物的方法减少化疗药物对正常细胞的杀伤力。如向肿瘤细胞中导入单纯疱疹病毒胸苷激酶基因，然后给予患者无毒性 GCV 药物，由于只有含 *HSV-TK* 基因的细胞才能将 CGV 转化成有毒的药物。因而肿瘤细胞被杀死，而对正常细胞无影响。

不管策略如何，基因治疗主要有三个要素：①首先选择合适的目的基因，即可以是与缺陷基因相对应的同源基因，或与缺陷基因无关(不对应)但有治疗意义的基因；②通过病毒载体和非病毒载体携带基因导入靶细胞；③选择合适的靶细胞。治疗基因只有通过靶细胞才能发挥作用(图 13.1)。

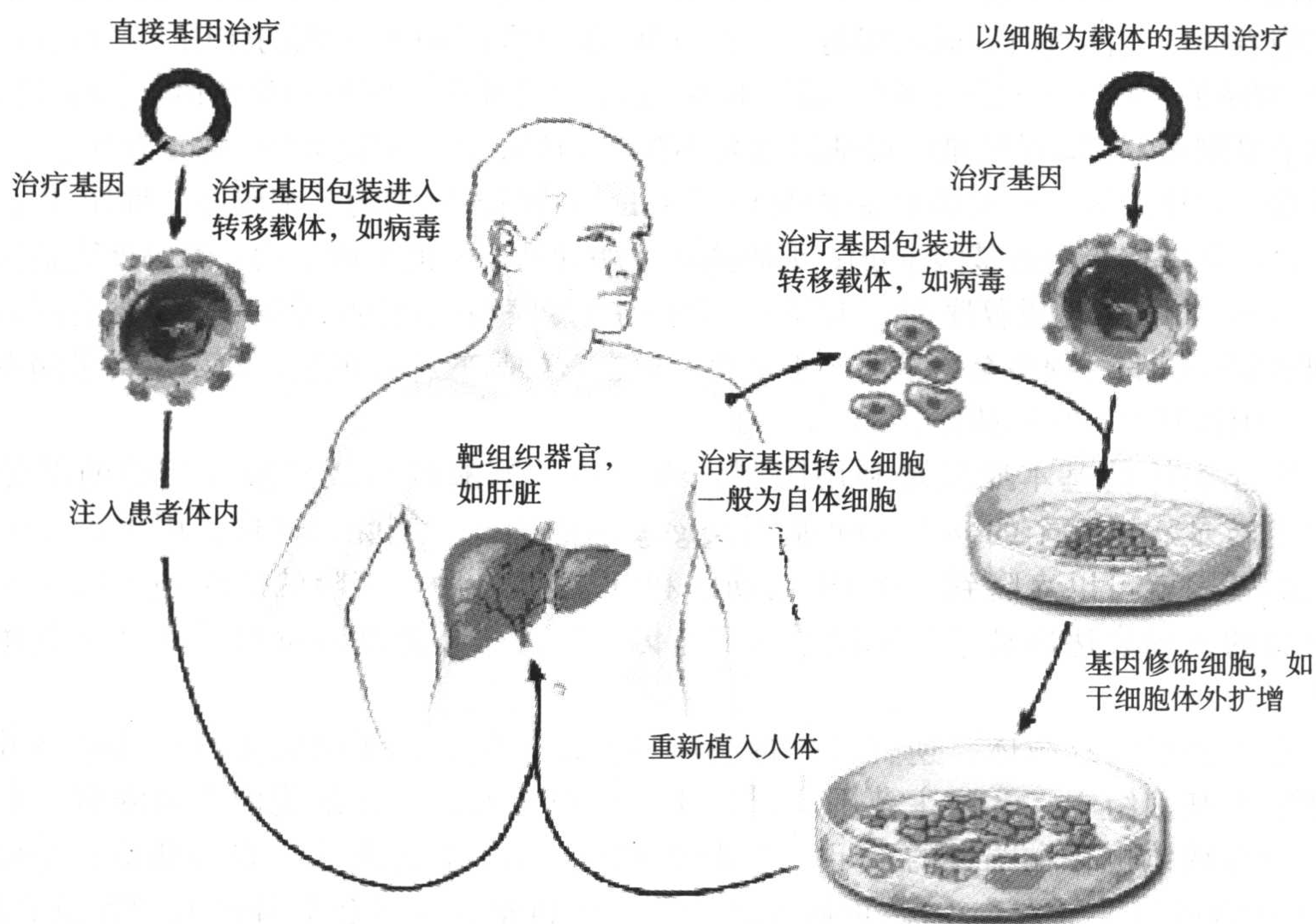


图 13.1　基因治疗的体内和体外疗法
(http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter11.asp)

13.1.2 基因治疗载体

在基因治疗中，需要有效的载体将目的基因导入靶细胞并发挥生物学效应。理想的基因载体应具备：①靶向特异性，并且可被免疫系统识别；②高度稳定，容易制备，可浓缩和纯化；③无毒性，对患者及环境安全无害；④有利于基因高效转移和长期表达。目前，在基因载体的设计上，大致可分为两大类，即病毒类和非病毒类。

13.1.2.1 病毒载体系统

病毒是在漫长的自然进化过程中存活下来的没有细胞结构的最小、最简单的生命寄生形式。它们通常可以高效率地进入特定的细胞类型，表达自身蛋白质并产生新的病毒粒子。因此，病毒是首先被改造作为基因治疗的载体，基因治疗临床项目中约有 85%采用病毒为载体。

13.1.2.1.1 逆转录病毒(retrovirus，RV)载体

逆转录病毒载体是最先被改造且应用最为广泛的基因治疗载体。逆转录病毒属于正链 RNA 病毒中的逆转录病毒科，逆转录病毒颗粒由类脂包膜和二十面体对称的核衣壳组成，它与其他病毒的一个显著区别是具有二倍体基因组，基因组正链 RNA 具有与真核细胞 RNA 类似的结构，即有 5′端帽子结构和 3′端 polyA 尾结构。逆转录病毒识别寄主细胞表面的受体蛋白后进入细胞，在自身基因组编码的逆转录酶的作用下，以基因组 RNA 为模板逆转录出双链 DNA。双链 DNA 能够整合到宿主细胞的染色体上，随着宿主细胞的复制而复制。逆转录病毒基因组大小在 8~11kb，每个单链 RNA 可分为 6 个区域，从 5′端开始依次为：长末端重复序列(5′-LTR)；组装时所必需的非编码序列称作 Ψ^+；编码衣壳内部结构蛋白的基因(*gag*)；编码逆转录酶和整合酶的基因(*pol*)；编码外壳蛋白的基因(*env*)；3′长末端重复序列(3′-LTR)。长末端重复序列在逆转录病毒 DNA 整合进入宿主细胞基因组的过程中至关重要，正是由于存在这种高效整合机制，使得逆转录病毒比较适合用作基因治疗的载体。

构建载体的基本原理是利用限制性内切核酸酶酶解以及核酸外切酶的部分酶解将逆转录病毒整个的 *pol*、*env* 基因及 *gag* 基因的 3′端删除，这样，用于治疗的正常人的基因就可以克隆到 5′-LTR 启动子和 Ψ^+区域之后。克隆的同时还可以引入带有自身的诱导表达启动子的选择性标记基因，这两个外源基因都可以在这个载体上表达。

作为基因治疗载体，逆转录病毒载体具有以下优点：①感染率高；②可高效整合到宿主基因组中；③宿主范围广泛；④免疫原性低；⑤在细胞内不易降解。但逆转录病毒载体也存在明显的不足，主要表现在：①不能感染非分裂的细胞；②外源 DNA 整合时可能导致突变(新近研究认为不是随机整合)；③包装外源基因容量有限，小于 10kb；④表达不稳定并难以控制；⑤要求靶细胞表面要具有逆转录病毒的相应受体；⑥制备纯化复杂。逆转录病毒载体中，最常用于人类的是莫洛尼(Mooney)鼠白血病病毒(murine leukemia virus，Mo-MLV)，其重组逆转录病毒的包装如图 13.2 所示。

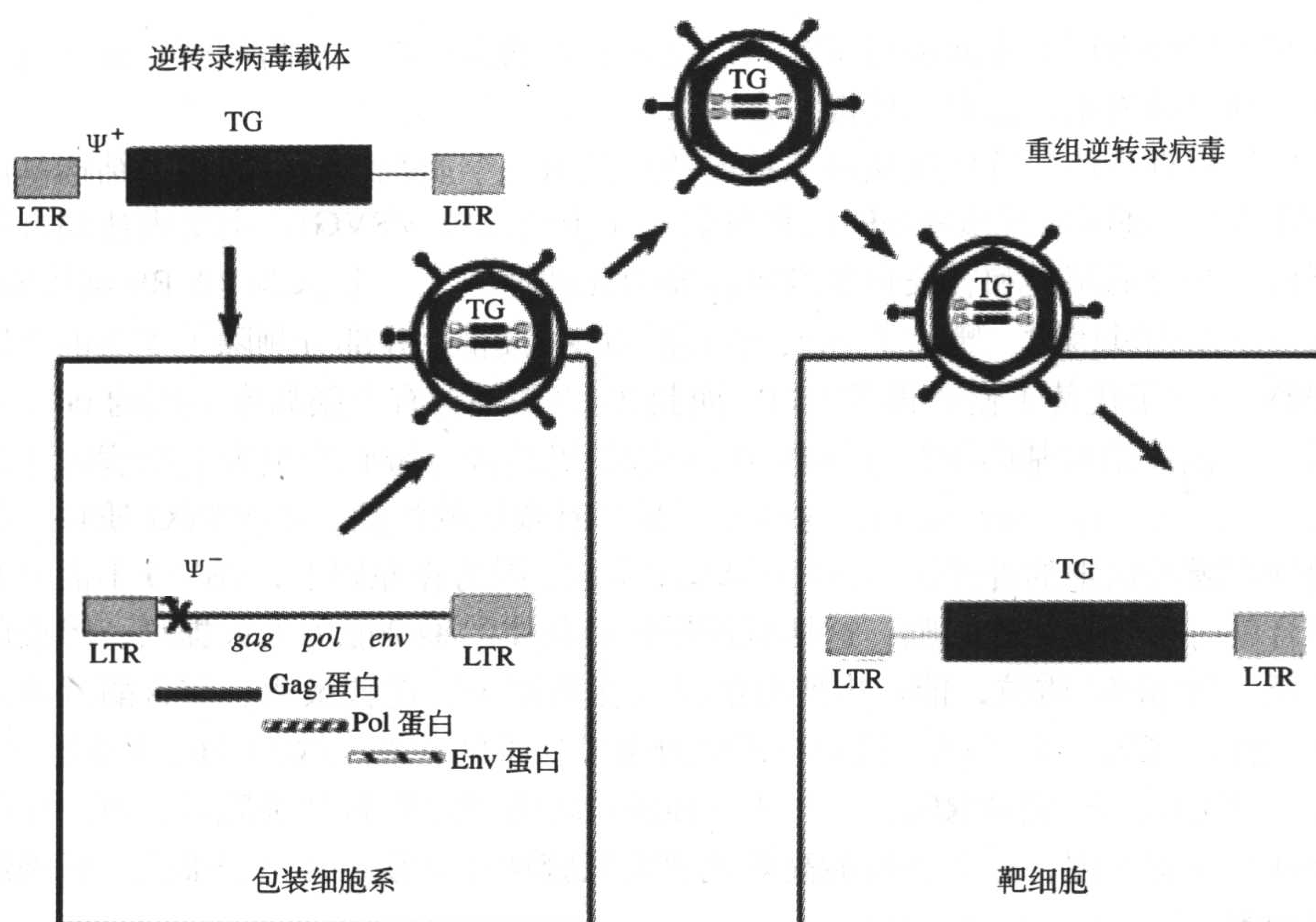


图 13.2 重组逆转录病毒的包装

13.1.2.1.2 慢病毒载体(lentivirus vector)

慢病毒是逆转录病毒中的一种，野生型慢病毒基因组是由两条相同的 RNA 单链组成，除含有与其他逆转录病毒共有的 3 个基因(*gag* 、*pol* 、*env* 基因) 外，其中 *gag* 基因编码病毒的核心蛋白(P7、P17、P24); *pol* 基因编码病毒的逆转录酶和整合酶; *env* 基因编码病毒的外壳蛋白成分；还含有 6 个辅助基因(*tat* 、*rev* 、*nef* 、*vif* 、*vpr*、*vpu* 基因)，这 6 种基因通过编码的蛋白质参与病毒的生物学功能。其中，Tat 蛋白能与病毒的长链末端调控区(LTR)区结合，启动转录；Rev 与病毒的 mRNA 剪接有关；Nef 能提高病毒的基因表达和复制水平；Vif 能提高病毒的感染能力；Vpr 参与病毒的进入细胞核过程；Vpu 能促进病毒颗粒的释放。病毒基因组的两端是病毒 LTR 重复序列，其中 5′端 LTR(含有 U3 启动子和转录起始位点 R 序列)与调节病毒的转录有关，3′端含有 polyA 信号和病毒的 LTR 序列。图 13.3 为 HIV-1 基因组的基本结构。

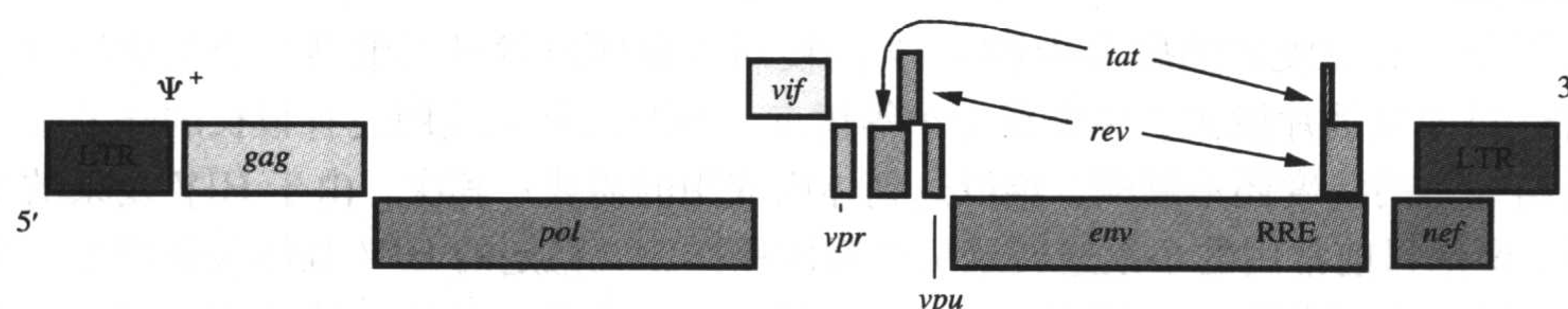


图 13.3 野生型慢病毒基因组结构示意图(Scherr 2002)

慢病毒载体系统的发展史主要是对慢病毒载体基因组的深入研究和改进的过程。自从实验性慢病毒载体产生以来，人们主要致力于减少慢病毒基因与宿主基因重组的能力

和阻止复制型慢病毒产生方面进行研究，以改善病毒的安全性，提高慢病毒载体包装基因的效率。到目前为止，已有三代慢病毒载体产生。

第一代慢病毒载体：这代慢病毒质粒的特点是由三个质粒组成，即包装结构基因质粒(pCMVΔ R9)、基因转移质粒(pHR′)和包装外壳蛋白质粒(VSVG)。主要表达病毒颗粒的核心蛋白、必要的酶类和转染包装细胞需要的几种辅因子。① pCMVΔ R9 载体质粒，在产生病毒的结构基因时，删除了 *env*、*vpu* 基因的可读框，并部分删除了 5′端的基因序列，用 CMV 启动子代替了慢病毒 5′-LTR。而其 3′-LTR 是含有牛胰岛素基因的 poly A 信号。但第一代包装结构基因质粒(pCMV 载体质粒)仍然含有编码产生野生型病毒蛋白因子的 *tat*、*rev*、*nef*、*vif*、*vpr* 基因，这些基因都具有致病的特性。② VSVG 质粒，是由编码水泡性口膜炎病毒的外壳蛋白(VSVG)基因组成。因为在原则上，VSVG 不需要和特定受体结合就可以感染宿主细胞，这样就使慢病毒载体的感染能力大大提高，感染的宿主更加广泛。③ pHR′ 质粒，能产生所有的反式作用因子、逆转录酶、整合酶以及内部基因表达元件(由 CMV 启动)等，该质粒编码野生型病毒的 5′端、3′端 LTR，5′端还有 *gag* 基因和 *rev* 基因反应元件(RRE)。当上述三种质粒转染 293T 包装细胞后，可产生高达 4×10^{8}IU/ml 的病毒滴度，这些病毒能高效地感染鼠脑神经细胞、肾上皮细胞和肌肉细胞等静止期细胞。

第二代慢病毒载体：在第一代基础上，这代慢病毒载体在生物安全性上做了大量的改进，包装结构基因质粒上进一步删去了编码辅蛋白 Nef、Vif、Vpr 的基因，产生的质粒为 pCMVΔR81911，这种改进并不影响病毒在 293T 细胞中包装，而缺失了 *vif*、*vpr* 基因也不会影响病毒颗粒对成纤维细胞和神经细胞的感染能力，并且缺失了 *nef* 基因同样不会影响病毒感染、进入靶细胞的能力，但缺乏 *vpr* 基因后，会使病毒对巨噬细胞的感染能力下降 50%。

第三代慢病毒载体：这代慢病毒载体的主要特征是构建了自我失活型的质粒(删除了病毒 3′端 LTR 上的 U3)。因为在病毒整合宿主基因组后，病毒 3′端 LTR 的 U3 发生跳跃后能启动病毒基因的转录。而 U3 是病毒的启动子，当删除病毒 3′端 LTR 的 U3 后，病毒基因组就不能复制，即使在发生病毒基因与宿主基因重组的情况下，病毒的基因组也不能被复制，因此只能转录整合的目的基因，消除了产生活性病毒的可能性。另一种改进是在慢病毒载体包装结构基因质粒 pCMVΔ R81911 上进一步删去了 *tat* 基因，产生的质粒为 pCMVΔR81913。总之，第三代慢病毒在不影响感染能力的前提下，其生物安全性大大提高。

来源于人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1) 的慢病毒载体虽然可以感染非分裂期细胞、容纳外源性目的基因片段大、免疫反应小等优点，但距离临床应用还有很长的路要走。首先，重组病毒的滴度还不够高，难以达到体内应用的需要；其次，由于 HIV 复杂的生物学性质，要像目前常用的小鼠逆转录病毒载体那样建立稳定的 HIV 载体包装细胞十分困难，已建立的包装细胞均不理想。据报道，Vpr 是一种使细胞进入静止期的强诱导剂，也是建立包装细胞的主要障碍之一。如果确如前文所述，包装质粒中的 *vpr* 基因并非必需、去除后不影响载体的转导能力，则建立稳定的包装细胞是大有希望的。

13.1.2.1.3 腺病毒载体

腺病毒在自然界分布广泛，至少分布在 100 种以上的血清型，其中人的腺病毒有 50

种以上。腺病毒是无包膜的线性双链 DNA 病毒，病毒颗粒是二十面体。腺病毒与宿主细胞膜上的特异受体结合经内吞作用进入细胞，其外壳被降解，而病毒 DNA 则进入细胞核，在细胞核中腺病毒并不整合到宿主细胞染色体上，而是以染色体外成分存在。腺病毒对上皮细胞、角膜和消化道上皮细胞具有天然的嗜向性。其基因组长 30~36kb，含有 14 个基因，两端各有一个反向末端重复区(ITR)，虽然腺病毒的种类非常多，ITR 序列却是它们所共有的特点，在病毒的复制中起着非常重要的作用。基因组上分布着 4 个早期转录元(E1、E2、E3、E4)承担调节功能，以及一个晚期转录元负责结构蛋白的编码。第一代腺病毒载体(adenovirus vector，AV)为 E1 或 E3 基因缺失，缺失区插入外源治疗基因，形成复制缺陷型病毒。但此类型载体可引发机体产生强烈的炎症反应和免疫反应，且表达外源基因时间短。第二代腺病毒载体则另外让 *E2a* 或 *E4* 基因缺失，则产生较弱的免疫反应，其载体容量和安全性方面亦改进许多，而第三代腺病毒载体则更为革命，它缺失了全部的(无病毒载体)或大部分腺病毒基因(微型腺病毒载体)，仅保留 ITR 和包装信号序列。第三代腺病毒载体最大可插入 32kb 的基因，病毒蛋白表达引起的细胞免疫反应进一步减少；载体中引入核基质附着区基因可使得外源基因保持长期表达，并增加了载体的稳定性。

腺病毒载体具有以下几个显著优点：①基因组大，因而可插入大片段外源基因；②可高效地转导不同类型的人组织细胞，体外实验通常接近 100%转导效率；③可转导非分裂细胞；④在细胞培养物中有高滴度的重组病毒产量，稳定，易于制备与纯化；⑤进入细胞内并不整合到宿主细胞基因组，仅瞬间表达，因而安全性较高；⑥可原位感染，不仅可通过静脉注射，还可经口服、喷雾、气管内滴注等途径进行治疗；⑦外源基因表达水平较高。腺病毒载体也是目前最常用的基因治疗载体之一，如 1994 年，美国科学家利用经过修饰的腺病毒为载体成功地将治疗遗传性囊性纤维病的正常基因转到患者肺组织中，使其在呼吸道上皮细胞内得以表达。又如在中国诞生的世界首个基因治疗药物——重组人 p53 腺病毒注射液(商品名“今又生”)，是世界上第一个获得正式批准的基因治疗药物。但同时腺病毒也存在一些不足：①免疫原性较强；②靶向性差，几乎可以感染所有的细胞；③因不能整合到宿主染色体上，所以不能持续表达所需产物，表达时间短暂，需重复给予载体制剂治疗。

13.1.2.1.4 腺相关病毒载体

腺相关病毒(adeno-associated virus，AAV)属于非致病性的细小病毒科家族的成员，是线性单链的 DNA 病毒，此类病毒基因组很小，为 4.7~6kb，其中包含两个可读框，分别编码调节蛋白及结构蛋白，基因组的两个末端各存在一个 145kb 的末端重复序列(ITR)，可以形成对称的发夹结构。ITR 序列对病毒的复制、病毒基因的整合、病毒颗粒的包装及病毒 DNA 从宿主细胞的切出等过程都有重要的调控作用。AAV 不能独立繁殖，只有依赖于辅助病毒通常为腺病毒才可能增殖(在正常细胞中偏向于潜伏感染)，腺病毒的 E1a 区对于腺相关病毒的转录是必需的，E2a 区对腺相关病毒的 DNA 复制、mRNA 从核内转移到细胞质中以及病毒蛋白的合成都有重要作用。腺相关病毒在没有辅助病毒帮助而单独感染细胞时，病毒基因组 DNA 可以整合到宿主细胞的基因组中，作为原病毒与宿主细胞长期共存，在整合进人的基因组时具有位点特异性，常整合进 19 号染色体的长臂上。当含有前病毒的细胞被辅助病毒感染后，整合的病毒 DNA 又可以被切出，

并完成复制周期，在这个过程中，必须调节蛋白参与。

在构建腺相关病毒载体时，可以将该病毒的基因组序列克隆到质粒载体中，删除 *rep*(编码调节蛋白)、*lip* 和 *cap*(编码结构蛋白)三个基因，在此位置插入外源基因和调控元件，同时要构建含有这三个基因的包装载体，将构建的腺相关病毒载体与包装载体一起共同转染已被腺病毒感染的细胞，此时该载体能够被包装形成重组病毒载体，为了避免发生因载体与辅助质粒重组而产生野生型病毒的情况，研究人员对辅助质粒进行了改造，把腺相关病毒的全部基因都置于腺病毒的反向末端重复序列的驱动之下，这样可以只产生重组的腺相关病毒，而不会有野生型病毒产生。

腺相关病毒载体具有以下优点：①目前尚未发现该病毒在人体中致病，所以比较安全；②感染宿主细胞广泛，包括非分裂细胞和分裂细胞，特别是能够感染神经元和神经胶质细胞；③能特异整合于人的第 19 号染色体长臂末端，减少了插入突变的可能性；④外源基因表达稳定，可达到 3 个月至 1.5 年；⑤反向末端重复序列中没有转录调控元件，这样减少激活原癌基因的可能性。存在的不足是：①需腺病毒辅助复制；②不能插入较大的外源基因，小于 4.7kb；③缺少高效的包装细胞；④制备纯化复杂。

13.1.2.1.5 纯疱疹病毒载体

纯疱疹病毒(HSV)属于疱疹病毒科，是双链 DNA 病毒，基因组大小为 152kb，其中含有 3 个复制起始位点和 3 个包装信号位点，在它的基因组中可以缺失多个基因，而病毒仍能保持复制能力，只要有正确的包装信号，外源 DNA 就可被包装成病毒颗粒。目前得到的单纯疱疹病毒载体主要有两类，即重组病毒型载体和重组质粒型载体。前者指在 HSV 的非必需区基因中插入一段外源基因，然后与侵染性病毒一起共转染细胞，在宿主细胞中两种病毒发生同源重组，再利用标记基因筛选重组病毒。后者指将 I 型单纯疱疹病毒(HSV-I)的复制起始位点和包装信号序列克隆到质粒中，用这种质粒和 HSV-I 辅助病毒一起转染细胞，质粒 DNA 可以串联在一起，包装在病毒颗粒中，所产生的病毒颗粒具有侵染其他细胞的能力。HSV-I 属于人嗜神经病毒，可在神经元细胞内建立潜伏感染。基于此原因，研究人员希望把 HSV-I 改造成为可定向导入神经系统的载体。野生型病毒感染神经元细胞后，通常处于潜伏感染状态，即其基因组以附加体的形式位于细胞核内，且不被人体免疫系统所识别，潜伏期可持续终生。当受到生理或周围神经损伤等刺激后，潜伏的人单纯疱疹病毒可被激活，而进入裂解性感染期。基于此，哈佛大学的姚丰博士利用病毒自身的“反式主要负调节物”而构建了一个既可抑制自身病毒复制，又可抑制野生型病毒复制的重组病毒。此病毒可以作为新型、安全的单纯疱疹病毒载体，用于临床试验的研究。

以单纯疱疹病毒构建的载体，具有以下优点：①宿主范围广，可以侵染脊椎动物的各种细胞；②载体易于操作；③包装外源基因的能力大，可插入长达 50kb 的外源基因；④具有嗜神经性，可从外周神经系统进入中枢神经系统，并且在神经元中潜伏下来，即病毒的部分基因保持转录活性，但却不影响神经元行使正常功能。这类载体也是目前唯一可以将外源基因和启动子导入神经系统的载体。由于这一特点，此类载体在一些神经系统疾病的基因治疗中有非常好的应用前景，目前这种载体已被用于治疗帕金森氏综合征、老年性痴呆症、恶性间皮瘤等疾病的治疗研究中。存在的不足是：①载体构建复杂；②无包装细胞株；③对人类有明显的致病性，能够从潜伏状态被激活。

13.1.2.2 非病毒载体系统

虽然病毒载体作为基因传递的工具广泛地被采纳，但它们仍存在不少的缺陷性：病毒性载体均可以诱导机体产生某种程度的免疫反应；存在着插入突变等致瘤、致毒的风险；载体容量有限；制备滴度不高等。而非病毒载体具有以下优点：①安全，无传染性；②不限制载体容量；③可大量制备；④无免疫原性；⑤无 DNA 组合。因此也受到许多研究人员和临床医生的青睐。

1) 裸 DNA

把携带外源基因的质粒直接注射或通过基因枪导入到组织细胞中，此方法主要应用于 DNA 疫苗(外源基因为病原体的有功能的基因片段)，可激发机体的细胞免疫和体液免疫。

2) 脂质体

是由脂质双分子层组成的颗粒，可介导基因穿过细胞膜。最常用的脂质体为阳离子脂质体，主要由带正电荷的脂类和中性辅助脂类等摩尔混合。阳性电荷的脂质体与带阴性电荷的 DNA 之间可以有效地形成复合物，通过内吞作用此复合物可进入细胞中。脂质体介导的基因转移尤其适用于恶性肿瘤的基因治疗，因该治疗不需要永久性的基因表达，暂时性的基因表达就能达到治疗的目的。脂质体是一种具有广泛应用前景的体内基因转移载体。

3) 多聚物

即利用阳离子多聚体如多聚左旋赖氨酸上的正电荷与 DNA 上的负电荷结合发生电性中和，而形成稳定的多聚物/DNA 复合物。该复合物仍带正电荷，可与细胞表面带负电荷的受体结合，而被摄入到细胞中。目前，一种新型纳米材料——树枝状聚合物作为基因治疗的载体的研究正在进行。

4) 分子耦联体

是外源 DNA 通过某种方式共价结合到细胞表面特异受体的配基或单克隆抗体或病毒胞膜蛋白等，利用特异的结合特性而介导外源基因导入到某一类型的细胞中。

以上几种方法在临床试验和基础研究应用颇多。目前所知的临床研究方案中，脂质体是除逆转录病毒载体以外，应用最多的基因传递方法(>20%)，特别是在肿瘤、囊性纤维化等疾病的治疗中应用较多。目前，非病毒载体最主要的不足是：①导入效率低；②表达水平低且短暂；③无特异靶细胞；④易被降解。因为外源裸 DNA 或复合物在进入靶细胞后，DNA 需要逃避内吞小泡、溶酶体及胞质中核酸酶的降解与破坏。

一个理想的载体系统至少必须满足两个条件：有效性和安全性。有效性包括所介导的遗传物质能够高效地进入所期望的靶细胞，而且不被血浆或组织细胞中各种补体以及各种酶所破坏。同时，转导基因能够透过核膜，进入细胞核，并整合于染色体 DNA 中，从而获得转基因的高效、稳定表达而发挥治疗作用。安全性则是指用于基因转移的载体不会引起宿主严重的免疫反应，不会因发生同源重组、回复突变导致野生病毒的产生，不会导致生殖细胞的感染以及不会导致插入位点的基因失活与基因突变等。因此，在临床治疗成为可能以前，没有一种是对基因的转移万能选择。图 13.4 展示了常用逆转录病毒载体、腺病毒载体和非病毒载体对细胞的转染情况。

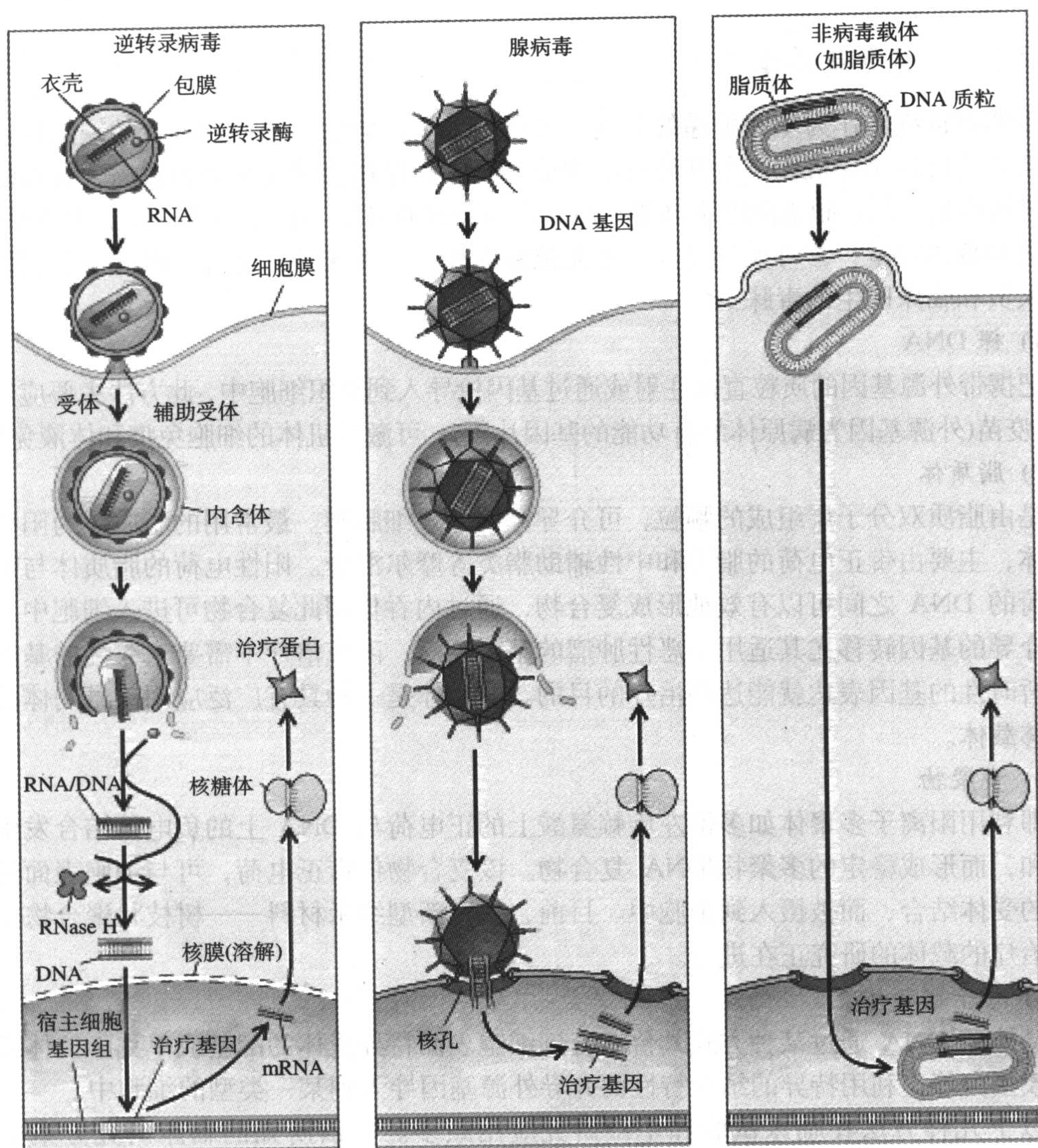


图 13.4 常用逆转录病毒载体、腺病毒载体和非病毒载体对细胞的转染情况

13.2 病毒介导的基因转导实验技术

13.2.1 逆转录病毒介导的基因转导

目前在基因治疗中较为常见的是由 Moloney 小鼠白血病病毒(MoLV)改建的各类逆转录病毒载体，保留了顺式功能结构，而敲除了 DNA 基因结构中的 *gag*、*env*、*pol* 三部分致病性的反式功能序列，并以外源基因替代空白区，故为缺陷型病毒，缺乏逆转录病毒的结构基因区，不能编码结构蛋白，不能包装成子代病毒颗粒。包装细胞为小鼠成纤维细胞系 NIH3T3 转染各种不同的辅助病毒所构成，可为逆转录病毒载体提供结构蛋白组分，因而二者相互补偿、结合，就能够包装成子代的病毒颗粒。由于这种病毒颗粒仍然是重组的逆转录病毒载体 DNA，这种子代病毒颗粒与野生型逆转录病毒颗粒的遗传物

质不同，故称假病毒颗粒，以出芽的方式从包装细胞膜上进入其培养上清中。逆转录病毒包膜中的蛋白质成分含有 *env* 基因表达的一种糖蛋白，而许多哺乳动物细胞有识别这种糖蛋白的特异性受体，二者结合可介导逆转录病毒进入宿主细胞，并有效地整合在宿主细胞染色体 DNA 中。

在逆转录病毒载体的外源基因中包括目的基因和标记基因，标记基因一般为新霉素耐药基因(*neo*)、潮霉素基因(*hyg*)和嘌呤霉素基因(*puro*)等，但多数用 *neo* 基因，故可用 G418 对转染后的包装细胞进行筛选与克隆。

13.2.1.1 材料与试剂

(1) 适当的包装细胞系(PA317)及含10%胎牛血清的DMEM或RPMI1640完全培养基。

(2) G418 的配制：取 100mg G418 溶于 2ml 重蒸水(50mg/ml)中 0.22μm 微孔滤过滤除菌，分装-20℃保存备用。

(3) 聚凝胺 Polybrene(储液浓度为 0.8g/ml)是一种多价阳离子，可降低病毒与细胞膜之间的相互排斥，有利于增加病毒的感染效率。Polybrene(Sigma)储液浓度为 0.8g/ml，0.22μm 滤膜过滤除菌，-20℃保存。使用终浓度为 8μg/ml。

(4) 2×HBS：取 1.6g NaCl，0.074g KCl，0.027g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$，0.2g 葡萄糖，1g HEPES 溶于 90ml 重蒸水中，用 0.5mol/L NaOH 精确调整 pH 为 6.95~7.05，然后用重蒸水定容至 100ml，用 0.22μm 滤器过滤除菌，分装 5ml/瓶，储于-20℃备用。此溶液中各组分浓度分别为 280nmol/L NaCl、10nmol/L KCl、1.5mmol/L Na_2HPO_4、12mmol/L 葡萄糖、50mmol/L HEPES。

(5) 2mol/L $CaCl_2$：取 10.8g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 溶于 20ml 蒸馏水，0.22μm 滤膜过滤，分装 1ml/瓶，-20℃保存备用。

(6) 阳离子脂质体转染试剂(如 Lipofectin™ 试剂)。

13.2.1.2 实验内容

13.2.1.2.1 重组逆转录病毒载体的包装及克隆筛选

1) PA317、NIH3T3 细胞的培养

复苏方法：从液氮中取出后于 37℃水浴剧烈振摇 1min，吸出细胞悬液入离心管，再滴加 8~10ml 培养基，1000r/min 离心 5min，弃上清，用适量培养基(含 10%胎牛血清，2mol/L 谷氨酰胺，100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基)稀释后接种入培养瓶中培养，次日换新鲜培养基，以后每 2~3 天换一次，细胞长满后根据需要传代。

传代方法：倾去培养基，用PBS液洗一次，加入胰蛋白酶消化液(50ml培养瓶加0.5ml，100ml 培养瓶加 1ml)，轻轻晃动培养瓶，室温或 37℃置 1~3min，加适量有血清培养基以终止反应，滴管反复吹打使细胞脱落成细胞悬液，将细胞悬液按所需密度接种入新的培养瓶中，于 37℃、5%CO_2的培养箱中培养。

2) G148 对于 PA317 细胞的最小致死量的测定

24 孔板接种适量的 PA317 细胞。细胞长成 50%~60%汇片时，加入含有不同浓度 G418(0.2g/L、0.3g/L、0.4g/L、0.5g/L、0.6g/L、0.7g/L、0.8g/L)的选择培养液。每 2~3 天换一次液，一周左右根据细胞死亡情况确定 G418 对于 PA317 的最小致死量。

3) 重组逆转录病毒载体质粒转染包装细胞 PA317

将外源基因导入 PA317 细胞的方法有多种，如磷酸钙共沉淀、电穿孔和脂质体介导的基因转染等几种方法，磷酸钙共沉淀的转染效率较低，已较少使用。电穿孔适用于质粒片段较大的情况。PA317 细胞耐受电击的能力很强，有实验者对其进行了从 200~1800V 不等的电击，细胞都能存活。最常用的是脂质体法。

(1) 磷酸钙介导转染 PA317 细胞。

质粒 DNA：经苯酚/氯仿反复抽提或玻璃奶纯化，OD_{260}/OD_{280}=1.8，用前除菌。

细胞：取旺盛生长期的 PA317 细胞以(1~2)×10^5 细胞/孔，接种 6 孔板，37℃、5% CO_2、饱和湿度培养 24h，待用。

细胞处理：取已长成 75%汇片的单层细胞，用新鲜的、无血清 DMEM 营养液洗涤 2~3 遍，换上新鲜生长液(pH7.2~7.4)。

磷酸钙/DNA 共沉淀物的制备：将重组逆转录病毒载体 DNA 溶于 0.1×TE(pH8.0)中，制成 0.02~0.04g/L 溶液，取 438μl 与 62μl $CaCl_2$ 混合制成溶液 A，将 500μl 2×HBS 的 B 液逐滴小心加入 A 液管中，室温作用 20~30min，即可见细小沉淀形成。

细胞/沉淀物作用：将沉淀物用吸管轻轻吹打一次，转移至上述细胞的培养液中，轻轻晃动，使沉淀物与营养液混合均匀，溶液呈混浊状，37℃、5%CO_2、饱和湿度培养。

(2) 电穿孔法转染 PA317 细胞：

a. 培养 PA317 细胞至对数生长中期，0.25% 胰酶消化，收集 PA317 细胞。以低血清或无血清的 DMEM 重悬细胞，制成 10^7 个/ml 的细胞悬液。

b. 重组质粒无菌化处理后，用无菌 HBS 溶解为 0.1μg/μl。

c. 混合 10^7 个/ml PA317 细胞与 10~20μg 的重组质粒，将混合物转移到电转杯内。冰浴 10min。

d. 设定电击条件：如 250V、950μF，电击 25~30μs。随后冰浴 10min。

e. 将电转杯内的 PA317 细胞转入培养瓶中，孵箱内培养。24h 后换液，加入无双抗的 DMEM 培养液，另加入 G418 筛选培养。

(3) 脂质体介导法转染 PA317 细胞

a. 质粒 DNA：经苯酚/氯仿反复抽提或玻璃奶纯化，OD_{260}/OD_{280} = 1.8，用前除菌。

b. 细胞：取旺盛生长期的 PA317 细胞以(1~2)×10^5 细胞/孔，接种 6 孔板，37℃、5% CO_2、饱和湿度培养 24h，待用。

c. 细胞处理：取已长成 75%汇片的单层细胞，用新鲜的、无血清 DMEM 营养液洗涤 2~3 遍，换上新鲜生长液(pH7.2~7.4)。

d. 脂质体/DNA 复合物的制备：在 500μl 无菌 Eppendorf 管中配液。A 液：将 1~2μg DNA 稀释于 100μl 无血清、无双抗 DMEM 营养液中。B 液：将 2~20μl Lipofectin 稀释于 100μL 无血清、无双抗 DMEM 营养液中，室温放置 30~45min。混合 A、B 液，轻微振摇混匀，室温孵育 10~15min。此时如果溶液浑浊，不影响转染；如果溶液有沉淀，则停止转染。

e. 细胞/沉淀物作用：将沉淀物用吸管轻轻吹打一次，转移至上述细胞的培养液中，轻轻晃动，使沉淀物与营养液混合均匀，37℃、5% CO_2、饱和湿度培养 5~24h。

注意：影响脂质体介导法转染效率的主要因素有几种：①适当的质粒和脂质体比例。

②转染时间。脂质体-质粒复合物转染细胞的时间在2~24h，多数细胞以6~8h最为适合。对于PA317细胞的转染，一般5~8h可以获得最好的效果，时间过少转染不充分，时间过多可引起细胞毒性反应，细胞生长状态差，不利于随后的筛选工作。③转染细胞的数量和状态。脂质体转染对于处于对数生长期且代谢活跃的细胞具有较高效率，同时转染时细胞接种的密度也较为关键。密度太低或太高均会影响转染效率。

4) G418抗性克隆的形成与筛选

(1) 包装细胞抗性克隆的形成：

a. DNA转染PA317细胞培养48~72h后，包装细胞可形成单层，用胰酶消化后按1∶3传代于6孔板内，继续培养至细胞密度达50%~70%融合。

b. 弃培养液，更换浓度为200μg/ml G418的DMEM培养液进行筛选，每天视细胞生长情况可酌情增加50~100μg/ml G418，增至G418最小致死量浓度(300~400μg/ml)，既可维持，并宜3~5天更换含维持量的G418培养液。同时用未加转染液的细胞作对照。

c. 一般在加入G418后的第3~5天，非转染的包装细胞开始死亡(可见未加转染液的对照细胞大部分死亡)，第10~14天后只剩下数量不多的转染细胞，其余全部死亡，但有新的细胞开始生长，并且逐渐生成抗性克隆。从开始包装至全部克隆形成，需要3~5周的时间。

注意：选择适宜的G418水平是在10~14天内杀死真核细胞的最低浓度。

(2) 抗性克隆的转移与扩增：

a. 将已形成克隆的培养皿置于显微镜下观察克隆位置，并将各个克隆位置用标记笔标记准确。

b. 在超净台内弃去培养皿内的培养液。

c. 用镊子夹取一块已高压的滤纸，用0.25%胰蛋白酶消化液浸润，置于所标记克隆处，5~20s。

d. 将24孔培养板每孔加G418选择培养基2ml，用镊子取出已黏附克隆细胞的滤纸片，置于一个孔中的培养基中，涮洗滤纸片数次，以使黏附的细胞脱下。镜下观察确认细胞已脱落后，将滤纸片去掉，将克隆细胞置于培养箱中培养2~5天。

e. 待细胞长满后，0.25%胰蛋白酶消化，并将细胞转移至6孔板继续培养扩增。

注意：用滤纸片黏附细胞克隆时间要适当，时间短可导致克隆黏附不到滤纸上，或黏附到滤纸洗脱后仍为细胞块而不是分散状态。时间长则导致细胞变性或死亡。

13.2.1.2.2 重组逆转录病毒毒液制备与保存

1) G418抗性细胞克隆扩增后病毒上清的制备

(1) 扩大培养的G418抗性细胞克隆，在收毒前一天将细胞1∶3或1∶4转代，待产毒细胞生长至50%~90%汇片时(16~24h)，弃去培养液，加入半量的、新鲜的完全培养液。

注意：要得到高滴度的逆转录病毒上清至少要等到转染后36h。此时，可以每间隔12h收获一次上清直至转染后72h，这期间病毒的滴度不出现显著下降。如果细胞在转染后24h仍较稀疏，这样得到高滴度的病毒上清需要等到72h以后。细胞在转染后48h仍未铺满，就不大可能生产出高滴度的逆转录病毒上清。

(2) 转染后大约48h收获病毒上清。如果在1~2h内使用逆转录病毒上清，可将其放

置冰上备用。时间间隔长时，可浓缩保存。

2) 病毒液的浓缩与保存

(1) 收集 48h 培养制备的各代病毒液于消毒过的培养瓶内，0.22μm 滤膜过滤。

(2) 可用差速离心法浓缩病毒上清，具体步骤为：4℃、1000r/min(250*g*)离心 15min。弃沉淀，将上清液于 4℃、3500r/min(730*g*)离心 2h，即为重组病毒液，加入 Polybrene 至终浓度 8μg/ml，分装，−70℃保存备用。

(3) 如不需浓缩可将过滤好的病毒液分装 Eppendorf 管内，每管 1ml，用封口膜封好，于−70℃冰箱或液氮中保存。

(4) 病毒可在 37℃水浴复苏，立即使用。

13.2.1.2.3 重组逆转录病毒的滴度测定

对于靶细胞而言，病毒受体的丰度以及细胞的生长状态是影响重组逆转录病毒体外感染的两个主要因素。我们选择处于对数生长期、鼠源的 NIH3T3 细胞系来满足这两个条件。从而为重组逆转录病毒体外感染靶细胞试验获得理想的结果提供了基本保证。

1) G418 对于 NIH3T3 细胞的最小致死量的测定

24 孔板接种适量的 NIH3T3 细胞，次日待其长成 50%~60%汇片时，加入含有不同浓度 G418 (0.2g/L、0.3g/L、0.4g/L、0.5g/L、0.6g/L、0.7g/L、0.8g/L)的选择培养液。每日观察细胞状态，每 2~3 天换一次液，一周左右根据细胞死亡情况确定 G418 对于 NIH3T3 的最小致死量。

2) 滴度测定

(1) 感染前 1 天将 NIH3T3 细胞按 5×10^4~5×10^5 个/孔接种 6 孔板，加入 2ml 完全培养液过夜培养。

(2) 将各克隆制备的病毒液作 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 稀释。

(3) 待细胞达 60%~80%融合时，弃去 NIH3T3 细胞培养液，分别加入稀释好的病毒液 1ml，吸附 1~3h，补加 2~3ml 含最低致死量的 G418 培养液，每 3 天更换 G418 培养液。

(4) 4 周左右可形成抗性细胞克隆，将细胞用瑞氏-吉姆萨染色后，统计细胞克隆数。病毒滴度=平均细胞克隆数×病毒稀释倍数，单位用 CFU/ml 表示。

如果病毒携带 *lac Z* 基因，则 X-gal CFU/ml = X-gal 阳性克隆数/病毒液体积(ml)。

3) 高滴度逆转录病毒的筛选

比较已知滴度的重组逆转录病毒，筛选出滴度最高的重组逆转录病毒，−80℃保存备用。

4) 重组逆转录病毒毒液感染目的细胞

将事先收集的病毒上清加入 60%融合的目的细胞中，并加入 polybrene 使终浓度达 8μg/ml。混匀后放于 37℃的 CO_2 培养箱中培养至 90%融合时，将细胞传代。部分细胞进行鉴定。

13.2.2 腺病毒介导的基因转导

构建重组腺病毒需要三个基本条件：①病毒衣壳 DNA，常用如 pAdEasy；②一种 Ad 表达质粒如 pAd-Track、pJM17，该质粒携带有基因表达元件，可插入目的基因，并带有与缺陷病毒衣壳 DNA 互补的病毒序列；③一种 E1 区缺陷互补的人胚胎肾细胞系 HEK293 细胞。

有缺陷病毒衣壳 DNA 病毒带有必需的关键序列(复制起始子和 DNA 包装序列)，它与腺病毒质粒 pAd-Track 一起作用，病毒衣壳 DNA 与插入的超出腺病毒包装长度限制的质粒序列互补，这些 DNA 序列共转染进入 E1 区互补的 HEK293 细胞后，表达质粒与病毒 DNA 在序列重叠区发生同源重组，重组一旦发生，就具备了病毒完成一个感染周期需要的条件：早期基因表达导致 DNA 复制，随后晚期基因表达，最后病毒包装成重组腺病毒(图 13.5)。

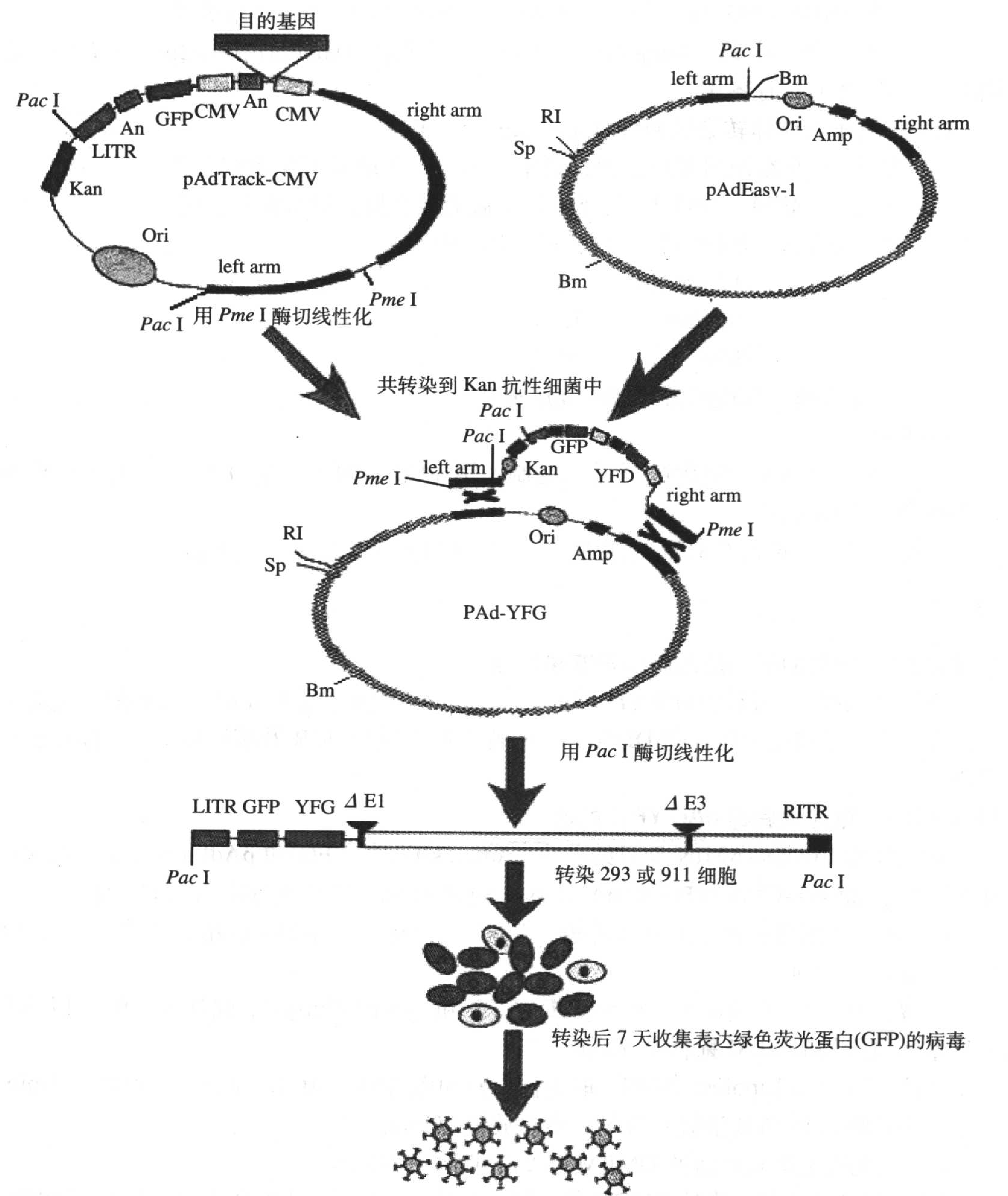


图 13.5 重组腺病毒载体的构建与病毒包装(Tang-chuan 1998)

因此构建高滴度的重组腺病毒一般需要以下几个步骤：①将目的基因插入腺病毒穿梭质粒；②重组腺病毒穿梭质粒与病毒衣壳载体共转染 HEK293 细胞，并进行基因重组；③通过噬斑分析筛选单克隆重组腺病毒；④重组腺病毒的制备；⑤重组腺病毒病毒滴度测定。

13.2.2.1 材料与试剂

(1) 人胚肾(HEK293)细胞系及含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基。

(2) G418 的配制：取 100mg G418 溶于 2ml 重蒸水(50mg/ml)中 0.22μm 微孔滤过滤除菌，分装-20℃保存备用。

(3) 阳离子脂质体转染试剂(如 Lipofectin™ 试剂)。

(4) 溶液 A: 1%组织培养琼脂糖，高压灭菌后，冷却至 42℃保温备用。

溶液 B: 2×DMEM、2×抗生素、5% 胎牛血清混合物，37℃保温备用。

(5) 病毒储存液：

0.1mol/L	Tris·HCl(pH7.5)
0.25mol/L	NaCl
1mg/ml	BSA
50%	甘油

甘油高压灭菌，其他溶液过滤或高压灭菌。

(6) PBS。

(7) 不同浓度 CsCl(氯化铯)溶液的配制：用 PBS 配制密度为 1.5g/ml、1.35g/ml 和 1.25g/ml 的 CsCl 溶液。

注意：吸入、摄入 CsCl 或经皮肤吸收 CsCl 均有害，配制时戴手套及护目镜。

13.2.2.2 实验内容

13.2.2.2.1 将目的基因插入腺病毒穿梭质粒

通过基因操作将目的基因(YFG)插入到腺病毒穿梭质粒(pAdtrack-CMV)的多克隆位点，然后重组子转化大肠杆菌 DH5α，对阳性重组子进行 PCR 及酶切鉴定。具体试验步骤略。

13.2.2.2.2 重组腺病毒 pAd-YFG 构建

脂质体如 LipofectAMIN 介导线性化 pAdtrack-CMV-YFG)和 pAdEasy-1(重组腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV-YFG 和 pAdEasy-1 经 *Pac*I 酶切线性化)共转染 293 细胞。

(1) 将 293 细胞接种于 6 孔培养板，4.5×10^5 个/孔，培养 24h 后用于共转染。每块 6 孔板准备以下试剂。

A 液：10μg DNA(4μg pAdtrack-CMV-YFG 和 6μg pAdEasy-1，或其他比例)，以不含抗生素和血清的 DMEM 稀释至 300μl。

B 液：取 20μl LipofectAMIN，取无抗生素和血清的 DMEM 280μl，室温放置 5min。

C 液：将 A 液和 B 液轻轻混匀，室温放置 20min。

(2) 用无抗生素和血清的 DMEM 将 293 细胞洗 2~3 次。

(3) 取 5.4ml 无抗生素的 DMEM 加入到 C 液中，混匀，加入 6 孔板的各孔中，1ml/孔，继续培养。

(4) 培养 6h 后更换含 5% FBS 的 DMEM，继续培养 10~20 天，2~3 天换一次培养液。

(5) 培养至第 12~14 天时，一般会出现明显的细胞溶解现象(cytopathic effect, CPE)，如图 13.6 所示。此时，回收细胞，−70℃保存，或−70℃、37℃反复冻融 3 次，5000r/min 离心 10min 取上清，−70℃保存备用。

注意：反复冻融后大量的病毒颗粒仍然留在细胞内，但是再冻融会降低病毒滴度。

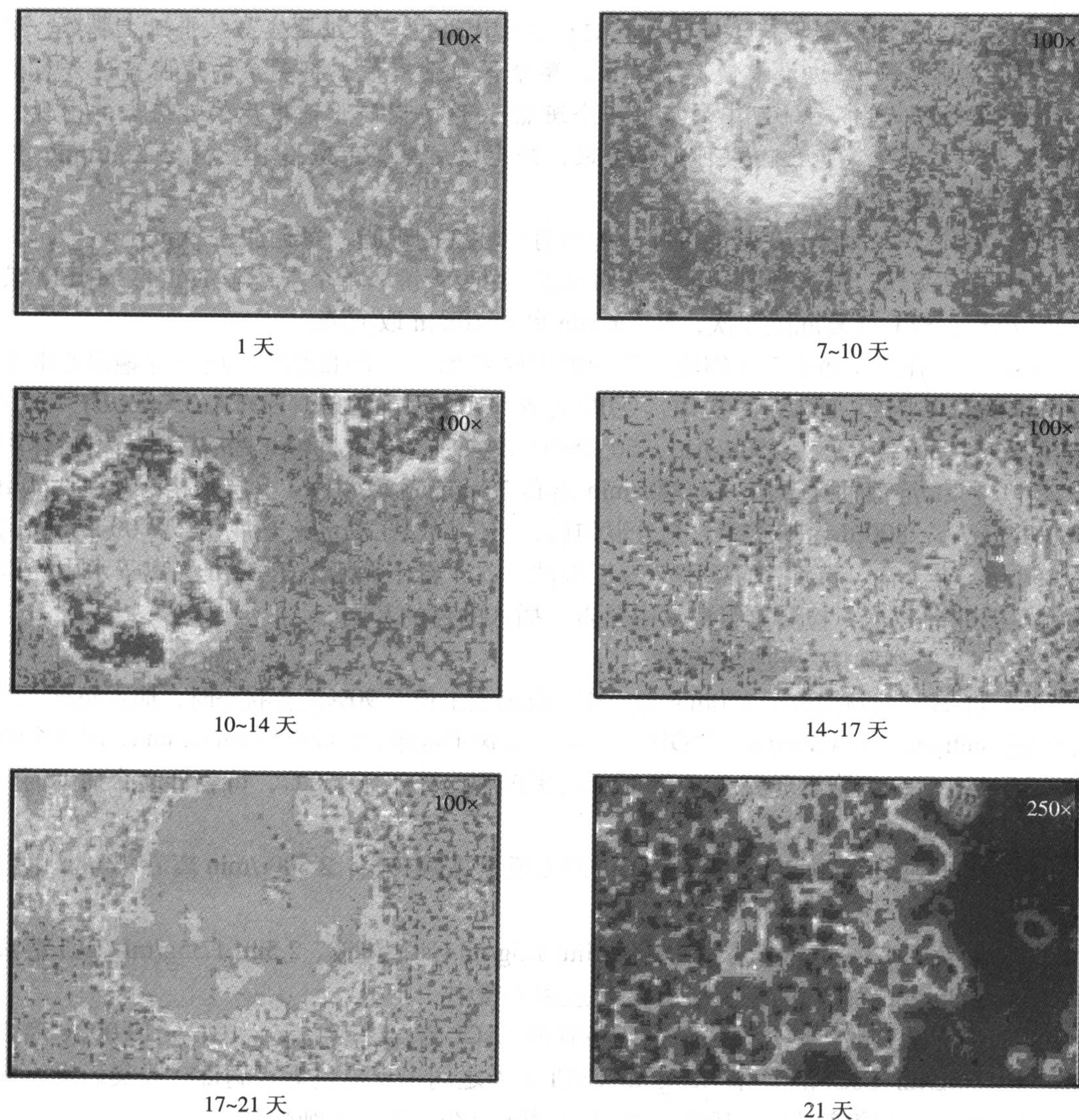


图 13.6 细胞溶解现象(Pictures Courtesy of Dr. Bruce C. Trapnell, University of Cincinnati)

13.2.2.2.3 单克隆重组腺病毒筛选及阳性鉴定

(1) 将 293 细胞接种于 6 孔板中，待细胞达到 80%融合时，进行下一步。

(2) 将重组病毒上清以 10 倍比稀释于 1ml 无血清的 DMEM 中，吸弃 293 细胞上清，加入病毒稀释液，37℃孵育 1h。

(3) 准备铺琼脂：

溶液 A: 1%组织培养琼脂糖，高压灭菌后，冷却至 42℃保温备用。

溶液 B: 2×DMEM、2×抗生素、5% 胎牛血清混合物 37℃保温备用。

将溶液 A 和溶液 B 等体积混合，注意不要产生太多气泡。吸弃第二步 293 细胞培养液，每孔加入 3ml 溶液 A 和溶液 B 的混合溶液，室温放置 30min 使其凝固。放回 37℃培养。

注意：①琼脂凝固较快，操作要迅速；②HEK293 单层细胞容易从平皿上脱落，铺板时应让琼脂从平皿边沿慢慢流下扩散，整个平皿铺满后，将剩余的琼脂盖住残留的 DMEM(DMEM 通常在平皿中聚集成一个斑点)，这可以防止铺板后软性斑点的出现；③3~5 天后，不用染色，肉眼可见噬菌斑，野生型病毒噬菌斑一般直径为 2~3mm，而重组型噬菌斑会小得多。

(4) 培养 3~5 天后，在其上再铺一层含有中性红的琼脂，每孔加入 2ml。

(5) 第 7~8 天，镜下观察病毒空斑的形成，用吸管挑取单个空斑于 1ml 的 DMEM 液中，−70℃、37℃反复冻融 3 次，5000r/min 离心 10min 取上清。

(6) 取上清再次感染 293 细胞，当细胞出现 CPE 时，回收细胞；反复冻融离心取上清用于病毒基因组 DNA 的提取。①取上清 370μl，加 16μl EDTA(0.5mol/L)、10μl SDS(20%)、8μl 蛋白酶 K(50ng/μl)，50℃孵育 2~4h；②加入 440μl 酚/氯仿/异丙醇(体积比 25∶24∶1)溶液抽提蛋白，13 000r/min 离心 25min；③取 400μl 上层水相溶液，加 40μl 3mol/L NaAc、800μl 无水乙醇，充分混匀后，−70℃放置 30min；④4℃、13 000r/min 离心 25min，弃上清，沉淀 DNA 用 75%乙醇洗一次，待干燥后溶于 50μl 去离子水中。以此为模板进行 PCR，检测重组病毒中是否有插入的目的基因。

13.2.2.2.4 重组腺病毒的扩增与纯化

(1) 将 293 细胞接种于 150mm 瓶皿中，待细胞生长至 90%汇合状态时，加入病毒，感染强度(multiplicity of infection，MOI)约为 10 个空斑形成单位(plaque forming unit，pfu)/个细胞，36~48h 后，细胞出现完全 CPE 时，收集细胞，冻存于−70℃，待累计多个瓶皿时，统一纯化病毒。

(2) 将出现 CPE 的 293 细胞−70℃、37℃反复冻融 3 次，2 500r/min 离心 10min 以除去细胞碎片。

(3) 制备 CsCl 密度梯度：依次将 0.5ml 1.5g/ml CsCl 溶液、2.5ml 1.35g/ml CsCl 溶液和 2.5ml 1.25g/ml CsCl 溶液加入 12ml 超速离心管中。

(4) 将冻融后的待纯化病毒液加于各管的 CsCl 密度梯度之上，10℃、15 000*g* 离心 1h，于 1.35g/ml CsCl 溶液和 1.25g/ml CsCl 溶液之间出现白色雾状病毒时收集病毒，并与 1.35g/ml CsCl 溶液混合；10℃、15 000*g* 离心 18h，进一步纯化病毒。

(5) 吸出病毒带，以 1~2 倍体积的 Hank 缓冲液稀释病毒，以 Hank 缓冲液为透析液于 4℃透析病毒，每 2h 更换一次透析液，共换液 5 次。

(6) 取出纯化的病毒液，加无菌甘油至终浓度 10%，分装，−70℃冻存。

注意：病毒毒液可用储存液 1∶1 稀释，−20℃保存。

13.2.2.2.5 病毒滴度测定

1) 260nm、280nm 光吸收的测定

取 20μl 纯化病毒，加 970μl Hank 缓冲液，10μl 10% SDS，混匀，以 990μl Hank 缓冲液加 10μl 10% SDS 为空白对照，测定 260nm 和 280nm 光吸收，读据此估算病毒的滴度(颗粒数/ml)和纯度。

2) 病毒感染滴度(pfu/ml)的测定

取 10μl 纯化病毒稀释于 990μl DMEM 中(10^2 倍稀释)，混匀后取 100μl 稀释于 900μl DMEM 中(10^3 倍稀释)，如此进行系列稀释直至 10^{12} 倍稀释；提前一天将 293 细胞接种于一块 6 孔培养板，接种量为 2×10^6 个/孔；24~36h 后，细胞长至 90%汇合状态时将各孔中的培养液吸出，分别加入 10^2~10^{12} 倍稀释的病毒液，培养 1~2h。

快速 CPE 分析：将 10^2~10^6 倍稀释的病毒液从各孔中吸出，每孔中加入 2ml 含 10% FBS 的 DMEM；培养 36~48h 后观察 CPE，选出发生 100% CPE 的稀释倍数；用下列公式计数病毒感染滴度：

病毒感染滴度(pfu/ml) = (2×10^6 个/孔)×稀释倍数×10/病毒液体积

噬斑试验：将 10^7~10^{12} 倍稀释的病毒液从各孔中吸出，每孔中加入 3ml 培养琼脂(由等体积的溶液 A 和溶液 B 组成，见单克隆重组腺病毒筛选及阳性鉴定)；继续培养 4~7 天，直至噬斑形成。选出噬斑数在 30~100 的稀释倍数，用下列公式计算病毒感染滴度。

病毒感染滴度(pfu/ml)=平均噬斑数×稀释倍数

13.2.3 慢病毒介导的基因转导

现阶段慢病毒载体已发展到采用三质粒包装系统，包括包装质粒、包膜蛋白质粒和转移质粒。其中包装质粒在 CMV 启动子的控制下，表达 HIV-1 复制所需的全部反式激活蛋白，但不产生病毒包膜蛋白及辅助蛋白 VPU；包膜蛋白质粒编码水泡性口炎病毒 G 糖蛋白(VSV-G)，应用 VSVG 包膜的假构型慢病毒载体拓宽了载体的嗜性范围，增加了载体的稳定性，可通过高速离心对载体进行浓缩，提高了滴度；转移质粒中含有包装、逆转录及整合所需的顺式序列，保留 350bp 的 *gag* 和 *rre*，并在其中插入目的基因或标志基因 *GFP*。

以慢病毒载体介导人凝血因子(hFIX)为例。

慢病毒可通过磷酸钙法三质粒(慢病毒载体 C-FUW 或 FUGW，包装质粒 CMVAR8.2 和包膜质粒 VSV-G)瞬时共转染 293T 细胞产生。

13.2.3.1 材料与试剂

(1) 质粒：慢病毒载体 C-FUW FUGW，包装质粒 CMVAR8.2 和包膜质粒 VSV-G。

FUXW：凝血因子 IX 的重组慢病毒表达载体。

FAXW：ABP 肝特异性启动子指导人的凝血因子 IX 的重组 HIV 载体。

(2) 适当的包装细胞系，如 HEK293 人胚肾细胞系和 BEK 大鼠肾成纤维细胞分别用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 和 RPMI1640 完全培养基。

(3) 2×HEPES(HBS)：取 1.6g NaCl，0.074g KCl，0.027g $Na_2HPO_4\cdot H_2O$，0.2g 葡萄

糖，1g HEPES 溶于 90ml 重蒸水中，用 0.5mol/L NaOH 精确调整 pH 为 6.95~7.05，然后用重蒸水定容至 100ml，用 0.22μm 滤器过滤除菌，分装 5ml/瓶，储于−20℃备用。此溶液中各组分浓度分别为 280nmol/L NaCl、10nmol/L KCl、1.5mmol/L Na_2HPO_4、12mmol/L 葡萄糖、50mmol/L HEPES。

(4) 2mol/L $CaCl_2$：取 10.8g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 溶于 20ml 蒸馏水，0.22μm 滤膜过滤，分装 1ml/瓶，−20℃保存备用。

(5) 聚凝胺 Polybrene(储液浓度为 0.8g/ml)是一种多价阳离子，可降低病毒与细胞膜之间的相互排斥，有利于增加病毒的感染效率。Polybrene(Sigma)储液浓度为 0.8g/ml，0.22μml 滤膜过滤除菌，−20℃保存。使用终浓度为 8μg/ml。

13.2.3.2 实验内容

13.2.3.2.1 细胞培养

293T 细胞用高糖 DMEM 培养基，培养液的配制方法：DMEM+10%牛血清+100U/ml 青霉素+100U/ml 链霉素。细胞传代 24h 后移去 2ml(10cm 培养瓶)或 5ml(15cm 培养瓶)的培养基然后留细胞在培养箱至少 1h。

BHK 细胞用 1640 培养基+10%小牛血清+100U/ml 青霉素+100mg/ml 链霉素培养。

注意：培养基移去后，不要再移动细胞，否则 pH 将改变，转染效率将变低。

13.2.3.2.2 磷酸钙转染

(1) 在 15ml 的聚酯管中混合下列溶液，20μl 的转移载体(10μg)，15μl 的包装质粒载体(7.5μg)，10μl 的 VSVg 包膜质粒载体(5μg)，加 130μl 的 2mol/L $CaCl_2$ 用水补充至 1ml 体积。

(2) 在试管中将 DNA+$CaCl_2$+H_2O 混匀，并尽可能快地注入 1ml 的 HEPES 溶液中，通过移液器上下混合 5 次，静置 1min。

(3) 将 DNA +$CaCl_2$ +H_2O HEPES 混合液加入到培养基中，并轻微摇晃，加入终浓度 1%的氯喹，然后把培养瓶放入培养箱中。

注意：应尽量减少细胞在培养箱外的操作时间，预防 pH 的变化，以免减少转染效率。

(4) 加入转染试剂后 3.5~5h 弃去培养基，用预热的 PBS 洗 2 次，换 10ml 预热新鲜含 10%的小牛血清的培养基。

注意：如果不用 PBS 洗，一些沉淀可能留在瓶底，将阻碍细胞的生长。

(5) 然后放培养瓶到培养箱中，放置 48~60h，收集细胞上清。

13.2.3.2.3 病毒浓缩

(1) 转染 48~60h 后，准备收集上清。

(2) 用 100%乙醇清洗超离心管并烘干。收集细胞上清到 50ml 的离心管中，2000r/min 离心 5min，移去大量的细胞碎屑。

(3) 用 0.45μm 的滤器过滤，将滤过的细胞上清放入到 40ml 的超离心管中，为防止溢出用 Parafilm 膜密封，在 4℃、25 000r/min，离心 90min。

(4) 将病毒上清倒入装有 10ml 漂白剂的烧瓶。倒掉离心管的残余培养基，加入 100μl 的 PBS 和 Hank 缓冲液溶解。用 Parafilm 膜密封，在 4℃中溶解 12h，然后把病毒分装在 10μl 的容器中，储存在−70℃的冰箱中。

13.2.3.2.4 慢病毒滴度测定

1) FUGW 滴度测定

将梯度稀释的病毒液加入 293T 细胞中，72h 后置于荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况，计数发荧光细胞数目，根据病毒用量和稀释度计算滴度。

2) FUXW、FAXW 的滴度测定

用 Southern 斑点杂交方法确定 FUXW、FAXW 病毒滴度。

(1) 重组慢病毒感染细胞 DNA 抽提：细胞 BHK 以 1×10^6 接种于 15cm 培养皿，在 37℃、5% CO_2 条件下培养 24h 后，换以新鲜培养液，加入 Polybrene 使其终浓度为 8μg/ml。轻轻混匀后，加入 20ml 的重组慢病毒病毒上清(0.45μm 微孔滤膜)，继续培养 24h 后，换以新鲜培养液，培养 72h 后，用胰酶消化细胞，500r/min 离心 5min 培养细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗 2 次，用等体积的消化缓冲液悬浮细胞。将样品在盖紧的管中于 50℃摇荡下温育 12~15h。等体积的酚/氯仿/异戊醇抽提样品，1700r/min 离心 10min，将上层水溶液转移至新管中。加入 1.2 体积 7.5mol/L 乙酸铵和 2 倍体积的无水乙醇，1700r/min 离心 2min 后用 70%乙醇洗涤，晾干，沉淀用 TE 重新溶解，使终浓度在 1mg/ml 左右。

(2) 点膜：提取重组慢病毒感染细胞的 DNA 后作系列稀释，点在尼龙膜上。阳性对照质粒 pCMV-hFIX 按照 60ng、6ng、600pg、60pg、6pg 的梯度点在尼龙膜上。

(3) 固定：尼龙膜在 2×SSC 洗过，120℃、30min。

(4) 探针制备：pCMV-hFIX 质粒经 *Hin*d III 限制酶酶切后，回收 1.5kb 片段，取 1μg 加水到 16μl 煮沸 10min，冰浴迅速冷却，加 4μl DIG-high prime，混匀，离心，37℃、20h。

(5) 杂交：膜在 DIG Easy hyb 杂交液 40℃振荡(封袋)，预杂交 30min(10ml/100cm^2)后倒掉杂交液。探针煮沸 5min 变性后冰浴迅速冷却，加入杂交液中(25ng/ml DIG Easy hyb 液)，将探针-杂交液混合液加入封膜的透明袋中(3.5ml/100cm^2 杂交液)，封袋 40℃振荡 16h。

(6) 洗膜。2×SSC，0.1% SDS 2×5min，15~25℃；0.5×SSC，0.1% SDS 2×5min，65℃。

(7) 倒掉最后的洗膜液，在室温下用 2×SSC 漂洗膜，并吸干多余的液体，用塑料膜包裹后放射自显影。

13.2.3.2.5 慢病毒载体的离体感染

1) 重组 FAXW、FUXW 病毒的离体感染

细胞 BHK、293T 和 L-02 以 1×10^5 接种于 6cm 培养皿，在 37℃、5% CO_2 条件下培养 24h 后，换以新鲜培养液，加入 Polybrene 使其终浓度为 8μg/ml 轻轻混匀后，根据需要分别加入 1ml 的 FAXW(1×10^7μg/ml)，FUXW(1×10^7μg/ml)，继续培养 24h 后，换以新鲜培养液，培养 72h 后，收上清，ELISA 测其 hFIX 蛋白的表达量。

2) 重组 FUGW 病毒的离体感染

细胞 293T 以 1×10^5 接种于 6cm 培养皿，在 37℃、5% CO_2 条件下培养 24h 后，换以新鲜培养液，加入 Polybrene 使其终浓度为 8μg/ml，轻轻混匀后，根据需要分别加入 1ml 的 FUGW 病毒悬液(2.5×10^6MOI)，继续培养 24h 后，换以新鲜培养液，培养 72h 后，在荧光显微镜(Leica，Germany)下观察 *GFP* 基因的表达，计数发荧光细胞数目，计算重组 FUGW 病毒的离体感染的转染率。

13.2.4 rAAV 总的生产策略

这个策略一般是一个四种成分的系统：①rAAV 载体。它保留了两个 ITR 之间是转基因或治疗基因克隆，这部分需要包装到病毒颗粒内。②AAV 互补基因。就是将 AAV 的 *cap* 和 *rep* 基因切除并插入另一个较大的质粒中形成互补质粒，由它提供所需的 *cap* 和 *rep* 互补基因产物。③腺病毒辅助基因。提供 E2a、E4 和 VA RNA 基因产物。④包装细胞。常常用 293T 细胞，它已经含有腺病毒基因 *E1*。

病毒受体常常确定病毒对该组织的趋向性和宿主细胞范围。最近研究表明，细胞表面的 HSPG AAV 黏附受体，FGFR 和 v5 整联蛋白在 rAAV 进入靶细胞中充当复合受体和促进因子。rAAV 载体在进入细胞核以后脱壳粒，释放载体基因。它必须由单链变为双链才能整合到细胞基因组和进行转录、表达。

rAAV 介导的外源基因持续表达传统上认为是由于整合，近年来研究表明，在 rAAV 潜伏感染的细胞中，rAAV 既可以取随机整合形式，也可以取染色体外游离体形式。由于 *rep* 基因被删除掉 rAAV 不能像 wtrAAV 那样特异性地整合到 19 号染色体的 AAVS1。这种游离体可以是 rAAV 单体 DNA 首尾相接的环状体，也可以是首尾相接的串联体。Yang 等证实了这种串联体的存在，进入细胞后的载体基因组是整合还是形成游离体，取决与转导的细胞类型，细胞的代谢和增殖状态以及所采用的转导条件。

总之 rAAV 的有效转导与表达必须突破三道屏障：①易感细胞表面是否表达 rAAV 的受体和辅助受体；②易感细胞中病毒 DNA 进入细胞核的通路是否存在；③ rAAV 病毒是否合成 DNA 的第二链或形成串联体。

13.2.4.1 材料和试剂

1) HEK293

是贴壁依赖型成上皮细胞，含有 Ad5 E1 区的人胚肾细胞，生长培养基为 DMEM(含 10% FBS)。为腺相关病毒的包装细胞。

2) AAV 载体包装系统

包括 pAAV-MSC(含有外源基因的多克隆位点，用于插入目的基因)、辅助质粒(如 Ad8)、腺病毒辅助基因或辅助病毒(如 Ad5)和包装细胞(如 HEK293)。

3) AAV Helper Free 包装系统

包括 pAAV-MSC、pHelper 质粒和包装细胞(如 HEK293)。pHelper 质粒可直接提供互补基因和辅助基因。它包含有必需的腺病毒基因 VA E4 E2A 和 rAAV 的包装基因(*rep*、*cap*)，因此不需要腺病毒提供辅助基因，包装 rVV 病毒颗粒时，只需将重组 AVV 载体与该质粒共转染到含有 E1 的 293 细胞即可，这样就避免了野生型 Ad 的污染。

4) OptiprepTM 分离液(AXIS-SHIELD)

主要成分是碘克沙醇(Iodixanol)，是一种高亲水性非离子的物质，这种主要成分决定了 OptiprepTM 分离液是一种高密度、低黏度的溶液。而且，它的密度和渗透性成线形关系，在加入适当浓度的缓冲液或基本培养基，如蔗糖、HEPES 或 PRMI 后，OptiprepTM 能形成连续的或不连续的等渗的密度梯度溶液，可将各种细胞、细胞器、脂蛋白分离开。

经科研和临床实验证明，OptiprepTM 和常规的分离液 Ficoll、Percoll、蔗糖及 CsCl 相比，OptiprepTM 分离液不仅分离纯化效果好，而且对各种细胞、细胞器的生命活性无任何影响。产品技术参数为 Iodixanol：60% (*m*/*V*)；密度：(1.320±0.001)g/ml；渗透压：(170±15)mOsm。

5) 5×PBS-MK

5×PBS	49.125ml
1mol/L $MgCl_2$	0.25ml (0.22μm 滤膜过滤除菌)
1mol/L KCl	0.625ml(0.22μm 滤膜过滤除菌)

6) 不同密度 Iodixanol 液的配制(表 13.1)

表 13.1 不同密度 Iodixanol 液的配制

密度	Iodixanol	5mol/L NaCl	5×PBS-MK	H_2O	酚红
15%	12.5ml	10ml	10ml	17.5ml	—
25%	20.8ml	—	10ml	19.2ml	100μl
40%	33.3ml	—	10ml	6.7ml	—
60%	60ml	—	—	—	100μl

7) 预杂交液

5×SSC、5% Denhardt(封闭剂)、0.1% (*m*/*V*) SDS、5%(*m*/*V*)甲酰胺。

8) 地高辛标记检测试剂盒

Roche 公司。

13.2.4.2 实验方法

13.2.4.2.1 重组 rAAV 病毒的包装

1) 磷酸钙共沉淀法

(1) DNA 溶液的制备：以 Promega 公司 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System 提取 AAV 包装系统中三种质粒 DNA，质粒 DNA 溶于无菌的 TE 中，以紫外吸收法测定其浓度及纯度，保证所提质粒的 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0，DNA 浓度在 500ng/μl 以上。

(2) 转染前 24h，HEK293 细胞以 5×10^6 个/ml 的细胞密度，接种于 200ml 组织培养瓶中，37℃、5% CO_2 培养箱内培养，待细胞密度达 60%~70%时即可用于转染。

(3) 向一灭菌离心管中加入所制备的三种质粒DNA(各20μg)溶液，无菌水定容至900μl，再加入 100μl $CaCl_2$ (2.5mol/L)溶液，轻轻混匀；逐滴缓慢加入 1000μl 2×PBS 缓冲盐溶液，轻弹管壁混匀，室温放置 20~30min，其间将形成细小沉淀。温育结束时，用小吸尖轻轻吹打一次，重悬混合液。

(4) 将 DNA-磷酸钙混合液转移至含单层细胞的培养液中，混匀，于 37℃、5%CO_2 培养箱内培养。

(5) 培养 24h 后倒去含有转染混合物的培养基，每瓶细胞加入 15ml 的 PBS 液，轻轻左右晃动一下培养瓶以洗涤残余的转染混合物，然后倒去。重复该步骤 3 次。

(6) 每瓶细胞中加入含 10%血清的细胞培养基 DMEM 15ml，于 37℃、5% CO_2 培养

箱内继续培养 48h。

2) 脂质体转染法(可参阅相关试剂盒说明书)

(1) 转染前 24h，HEK293 细胞以 5×10^5 个/ml 的密度，接种于 30ml 组织培养瓶中，37℃、5% CO_2 培养箱内培养，待细胞密度达 60%~70%时即可用于转染。吸去细胞培养液，用 1ml 完全 DMEM 培养液洗涤一次。

(2) 用 2ml 无血清 DMEM 重悬重组载体 DNA(5μg)。加入脂质体 5μl，辅助质粒 Ad8 5μl，轻轻混匀。然后加在 293 细胞上。37℃、5% CO_2 培养箱内培养。

(3) 培养 12h 后加入辅助病毒 Ad5 5μl，继续培养 48h。

13.2.4.2.2 病毒的收获

(1) 取 10 瓶转染后 72h 的 HEK293 细胞，倒去细胞培养基，以 PBS 液将细胞吹下。

(2) 4℃、4000*g* 离心 10min，回收细胞。

(3) 倒出上清液，将离心管倒置 30~60s 以使残留上清液流尽。

(4) 加入 6ml 细胞裂解液(10mmol/L Tris · HCl，pH8.5，150mmol/L NaCl)溶液，轻轻振荡，重悬细胞。

(5) 将细胞于-70℃中 15min，然后置于 37℃中 15min，每次冻融之间剧烈涡旋。重复 4 次。

(6) 4℃、4000*g* 离心 10min，将上清液转移至一干净的 50ml 离心管中，将该病毒粗提液于-70℃保存。

13.2.4.2.3 病毒的纯化

1) CsCl 平衡梯度离心进行纯化

(1) 从-70℃冰箱中取出病毒粗提液，于 37℃中融化，加入固体 NaCl 至终浓度为 1mol/L 以及 PEG 8000 至终浓度为 10%(*m/V*)，振摇溶解后冰浴放置 1h，11 000r/min 离心 15min，弃上清，然后加入密度为 1.38g/ml CsCl 溶液重悬沉淀。

(2) 将上述配好的密度液于 4℃、55 000r/min(Beckman SW41)离心 24h。

(3) 小心吸取病毒层液体，放于无菌的 1.5ml 离心管中。

(4) 病毒液置于-70℃冰箱保存。

注意：对于转染培养的细胞，用 rAAV 的粗提物即可；但如果用于动物实验，则需进行若干次氯化铯平衡梯度离心进行纯化，因为即使污染了很少量的腺病毒(无论灭活与否)都能造成病毒接种部位的局部炎症反应。

2) OptiprepTM 分离液密度梯度离心法分离 rAAV

(1) 细胞冻融后加入非特意性核酸酶 Benzonase(50U/ml)，37℃孵育 30min。

(2) 6000r/min 离心 20min，收集上清即为病毒粗提液。

(3) 用无菌 PBS-MK 缓冲液配制不同浓度的 Iodixanol，分别为 25%、40%、60%。

(4) 将上清及不同浓度的 Iodixanol 液依次加入 Becman Quick-Seal Ultra-Clear 离心管中，加入顺序为 4.5ml 病毒上清，2.7ml 15% Iodixanol/1mol/L NaCl，1.8ml 25% Iodixanol，1.5ml 40% Iodixanol，1.5ml 60% Iodixanol，热封口，Type70Ti(Beckman)于 18℃、69 000r/min 离心 1h。

(5) 针筒注射器小心抽吸 40% Iodixanol 和 60% Iodixanol 之间的条带，即为 rAAV 分离液。-70℃冻存。

3) 用 Millipore PKF 浓缩柱浓缩 rAAV(略)

13.2.4.2.4 病毒纯度的检测

按《分子克隆实验指南》方法灌制 SDS-PAGE 分离胶和积层胶，分离胶浓度为 10%，积层胶浓度为 5%。分别取未纯化病毒液和纯化后病毒液 10μl，加 2×上样缓冲液 10μl，沸水浴 3min。每个加样孔加样 10μl，电泳完毕后以固定液(甲醇：乙酸：H_2O 为 5：1：4)固定 20min，用考马斯亮蓝染色，以相应的脱色液(含 5%甲醇、7%乙酸)脱色直到显出低背景、清晰的条带。

13.2.4.2.5 病毒滴度测定

rAAV 的滴度测定可根据情况采用以下不同的方法进行。

(1) 测定外源基因的表达：测定外源基因的表达是确定 rAAV 滴度的最严格的方法。阳性转染信号表明 rAAV 成功地感染了细胞、发生脱壳、使外源基因得到了表达，而且表达水平足以用合适的方法检测到。然而，由于在不同的外源基因表达的检测上没有统一的标准，因此携带不同基因的 rAAV 在产量上不便比较。

(2) 复检中心检测：在复制中心检测(replication center assay，RCA)中，已向细胞提供了 rAAV 复制所必需的全部成分，用野生型 AAV 提供了 AAV 的 Rep 和 Cap 蛋白，用腺病毒提供辅助功能。阳性信号代表 rAAV 成功地感染了细胞，发生脱壳，并有能力复制。但该方法不能检测出外源基因表达盒是否完整。

(3) 点杂交或 Southern 杂交：该项检测采用外源基因表达盒的 DNA 探针，与得到的 rAAV 基因组进行杂交。阳性信号代表已制备出 rAAV 毒粒，但不代表病毒具有感染性或外源基因表达盒有功能。目前更倾向于采用 Southern 杂交代替点杂交，这是因为在 rAAV 制备过程中可能产生一些缺陷的干扰基因组，这些缺陷的基因组可被包装成病毒颗粒，在做点杂交时也会出现阳性信号。因此点杂交检测出的阳性信号不能准确地反映出被包装的全长基因组的数量。

目前一般采用非同位素特异性探针斑点杂交法检测病毒滴度。原理是选用 AAV/某载体质粒(如 pSNAV)载体质粒作为标准，根据 Avogadros number 值和 AAV/某载体质粒载体质粒的 kb 数，就可求得其分子质量，又用分光光度计测出该质粒的浓度后，就可得出其拷贝数为 10^{10} 时的体积，然后成 1：10 做系列稀释后点膜作为阳性参数，样本点膜后与之对照来确定其拷贝数和滴度。具体操作如下：

(1) 将含有病毒的 293 细胞反复冻融 3 次，然后 4℃、8000*g* 离心 15min，收集上清，除去细胞碎片。

(2) 取 40μl 含有病毒的上清液按下列反应体系除去其中游离的 DNA 和 RNA。

pAAV-MSC	40μl
10×DNase 缓冲液	20μl
DNase I	1μl
RNase I	4μl
无血清 DMEM 培养基	135μl
总体积	200μl

于 37℃孵育 1~1.5h。

(3) 上述反应液 200μl 按下列反应体系去除 DNase I、RNase I 和病毒的外壳蛋白。

上述反应液	200μl
2×蛋白酶 K 反应液	200μl
蛋白酶 K	10μl

于 37℃孵育 1~1.5h。

(4) 加入等体积的酚：氯仿：异戊醇(25：24：1)抽提一次，4℃、12 000g 离心 15min，回收水相，再用等体积氯仿抽提一次，回收水相。

(5) 将含有病毒 DNA 水相加入等体积的 0.4mol/L NaOH/10mmol/L EDTA 溶解变性。

(6) 将含有已知分子数的对照质粒和步骤(5)的病毒 DNA 溶液分别于沸水加热 5min 后，冰上冷却 2min，随后用 0.4mol/L NaOH/10mmol/L EDTA 各按一定的比例稀释。

(7) 裁几张与抽滤加样器一样大小的滤纸，6×SSC 浸湿，然后平铺于加样器的夹层中。

(8) 将预裁剪好的尼龙膜，先用去离子水浸泡 5min，再置于 6×SSC 的表面让其自然浸没，浸泡 10min 后，置于斑点杂交仪夹层中的双层滤纸上。将尼龙膜铺平后，将斑点杂交仪的顶层按要求安装好，并确保装置中不漏气。

(9) 连接真空泵与抽滤加样器，每孔加 400ml 去离子水，真空抽干。

(10) 将对照质粒和病毒 DNA 按稀释顺序分别点样，同时真空抽干。每孔再加 100ml，0.4mol/L NaOH/10mmol/L EDTA，清洗一次并抽干。

(11) 拆卸装置，将膜置于一张浸过变性液的滤纸上，放置 10min。再将膜转至一张滤纸上，晾干。

(12) 将膜夹于 2 张滤纸之间，放于烤箱中，80℃烤膜 2h。

(13) 将膜正面朝外，置于杂交瓶中，加入预杂交液 5ml，在杂交炉中 42℃预杂交 1h。

(14) 用地高辛(DIG)标记外源基因表达盒的 DNA 探针(探针制备略)。将标记好的 cDNA 探针变性，置 100℃、5~10min，然后冰浴 2min。将探针加入到预杂交液中杂交 12~16h。

(15) 弃杂交液，42℃时用 2×SSC/0.1% SDS 和 0.5×SSC/0.1% SDS 的中等苛刻条件下洗膜各 2 次，每次进行 15min。

(16) 在 56℃用 0.1% SDS 以更苛刻的条件洗膜 2 次，每次 15min。

(17) 取出尼龙膜在室温下用 2×SSC 漂洗膜，并吸干多余的液体，膜在新配制的显色液中显色 1~2h，37℃。

(18) 终止显色反应：挤出显色液弃去，用蒸馏水洗膜片，根据样本病毒 DNA 和对照质粒的斑点强度，最终确定病毒的滴度。

(19) 计算标准质粒(如 pSNAV-2)的相对分子质量(表 13.2)。

相对分子质量 = 2×质粒长度(碱基数)×碱基平均相对分子质量

$= 2\times7015\times320$

$= 4.576\times10^6$

(20) 计算标准质粒对应的拷贝数：

如 7.6ng pSNAV 的拷贝数 $= 7.6\times10^{-9}\times6.02\times10^{23}/4.576\times10^6$

$= 10\times10^8$

(21) 结果判定：

比较样品与标准质粒的杂交信号强度，确定 rAAV 滴度。计算公式为：

$$\text{rAAV 滴度(vp)} = \text{对应的拷贝数} \times 2 \times 1000$$

表 13.2 标准质粒对应的拷贝数

标准质粒 pSNAV	质量/ng	拷贝数
1	14.2	20×10^8
2	7.6	10×10^8
3	3.8	5.0×10^8
4	1.9	2.5×10^8
5	0.95	1.25×10^8
6	0.48	0.625×10^8

13.3 干细胞的转染

13.3.1 造血干细胞的转染

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)具有自我更新和分化为血液及免疫系统中各种成熟细胞的能力，许多 HSC 疾病，如遗传性、代谢性、感染性疾病或恶性肿瘤等有望通过基因治疗的方法得到纠正。目的基因转移 HSC 后，可随着 HSC 的自我更新和分化在体内长期表达，因此，HSC 是较理想的基因转移靶细胞。

13.3.1.1 逆转录病毒

逆转录病毒是目前造血细胞基因转导最主要的载体系统，它能有效地将外源基因整合到宿主基因组中，使外源基因稳定表达而不丢失。

造血干细胞基因治疗的主要目标是使转导基因最大限度地在靶细胞上整合和表达，而又不影响转导细胞自我更新和分化能力。众所周知，逆转录病毒必须有效地与靶细胞表面特异性结合，才能将病毒 cDNA 整合在宿主基因组中，而且只能感染分裂期细胞，但大多数造血干细胞处于静止期，在体外细胞因子刺激造血干细胞进入周期的同时，往往会减损干细胞的长期植入能力。因此在防止干细胞分化的条件下，短时期内诱导干细胞进入细胞周期，可在一定程度上提高转染效率。目前研究表明一些细胞因子与某些细胞外基质成分可刺激干细胞进入细胞周期。

白细胞介素-3(interleukin-3, IL-3)、白细胞介素-6(IL-6)和干细胞因子(stem cell factor, SCF)等细胞因子的组合可以刺激 HSC 进入细胞周期，在保持其造血重建功能的同时，提高了转导效率。

SCF、FL 和 TPO 被认为是能提高造血干细胞逆转录病毒转导率的最有前途的细胞因子组合。造血生长因子 FLt3 配体(FL)和 TPO 在体外造血干细胞基因转导过程中，能促进干细胞的生存和增殖，FL 是与造血调控有关的早期造血生长因子，与干细胞因子协

同作用于造血干细胞促进干细胞的分裂和增殖，提高逆转录病毒基因转导率；TPO 除能促进巨核细胞成熟与血小板生成外，还参与早期造血过程，通过缩短 G_0 期刺激细胞周期内的祖细胞增殖分裂。国外最新研究报道，在基质细胞支持下 TPO、FL 和 SCF 组合培养 48h 后，外周血早期造血祖细胞逆转录病毒转导效率显著提高。

基质和细胞外基质成分如细胞外基质蛋白——纤维连素能提高细胞转导效率。目前认为，纤维连素是促进转导的一种重要成分，尤其是含有整联蛋白和肝素结合区的 C 端片段，通过聚集逆转录病毒和靶细胞而增强转导效应。此外，纤维连素还能通过由整联蛋白介导的信号传导途径，保持人造血干细胞长期再植入能力和分化能力。

由于不同的研究者所用的载体类型、目的基因和靶细胞种属的差异，目前尚不能确定公认的最佳转染方式和条件。但有一个总的原则，就是促使静止状态的多能造血干细胞由细胞周期的 G_0 和 G_1 期，进入 S 期，从而有利于逆转录病毒的转染并整合入干细胞染色体上。从发展趋势来看，采用含高滴度病毒上清转染方式，结合利用基质细胞层的支持和外源性细胞因子，不管从感染效率，还是从安全性和简便性方面考虑，均较合乎临床基因治疗的实际而易被采用。

13.3.1.2 慢病毒载体

HSC 属于非分裂细胞，逆转录病毒载体介导的基因转移，需要以不同细胞因子的组合刺激其分裂，分裂过程中核膜破裂，目的基因才可能整合到染色体;而慢病毒载体在感染的过程中可形成前整合复合物(preintegration complex) 。前整合复合物由病毒 DNA、整合酶、*vpr* 基因产物(viral protein R)、*gag* 编码的基质蛋白(matrix，MA)、逆转录酶、核衣壳蛋白及细胞蛋白 HMGI 构成。其中基质蛋白含有可被胞核运输机制识别的定位信号，前整合复合物可定位到核孔，然后通过核孔进入细胞核，即不需要有丝分裂，因而可以有效感染 HSC。

HIV-1 载体对 G_0 期细胞的转导效率不如对静止于 G_1/S 或 G_2 期的效率高，停止于 G_0 期的时间越长，这种差别越大。这可能是由于某些 G_0 期细胞内脱氧核苷酸浓度低、影响了逆转录步骤，造成报道基因未表达所致的表面现象。研究表明，在无细胞因子刺激 HSC 分裂的情况下，虽然慢病毒载体可感染原始的 CD34+CD38–Thy21+Lin–HSC，但长期处于 G_0 的 HSC 仍不能被慢病毒载体有效地感染。慢病毒载体对处于 G_1 或 S/G_2 M 期 HSC 的感染效率是处于 G_0 期 HSC 感染效率的 3~4 倍。而当在培养基中加入适当的细胞因子(如 Flt23、c2Kit 等)后，可以使慢病毒对处于 G_0 期 HSC 的感染效率成倍的提高。

为提高转基因表达效率，目前已经筛选了许多内部启动子来促进转移基因的表达。人们将病毒的启动子、增强子、人和鼠的调控基因以及合成的启动子引入慢病毒载体，以此来提高基因在 HSC 内的稳定表达。大量研究表明，应用鼠系干细胞病毒(MSCV)、肌增生瘤状病毒(MPSV)等 U3 启动子能有效促进目的基因在 HSC 内高效地表达。此外，人的管家基因(hEF1α)、人或鼠 PGK(多磷酸腺苷激酶)、CAG(由人类巨细胞病毒立早基因增强子和鸡β-肌动蛋白(actin)启动子组成的复合启动子)等基因启动子也被应用到慢病毒载体的改造研究，并取得了较好的效果。对已经应用的内部启动子，如巨细胞病毒(CMV)启动子、鼠干细胞病毒(MSCV)启动子、磷酸甘油酸激酶(PKG)启动子、延长因子12A(EF1-α)启动子进行比较。其中，CMV 启动子效率最低而 EF1-α启动子效率最高。最

近，用杂合性 HIV/MSCV 的 LTR 可提高转基因的表达，比 CMV 启动子的效率高 10~100 倍。Salmon(2000)等比较了用 hEF1α、PGK 及 CAG 三种启动子改造后的慢病毒载体效果，发现 hEF1α启动子能促进目的基因在 CD34⁺的 HSC 以及其分化产生的细胞系内高效表达，并表明 hEF1α启动子能促进基因在人的 T 淋巴细胞中表达。还有研究发现，在 CD34⁺的 HSC 细胞系(KG1α)内，hEF1α和 CAG 启动子提高基因表达的效率是 hCMV2IE 启动子的 3~4 倍，而应用 MSCV 的 U3 或 PGK 启动子提高基因表达的效率至少是 hCMVIE 启动子的 2 倍。

为提高目的基因的高效表达，有学者又对慢病毒启动子进行了修饰，如引入增强子和 Woodchuck 病毒转录后调节元件(WPRE)等手段。研究表明，将 WPRE 的 DNA 序列放至目的基因的下游以后，能增强转录后 mRNA 的稳定性，提高转录后 mRNA 的剪接效率，且 WPRE 能增强目的基因在 HSC 内表达，使弱的启动子(如 PGK)启动基因表达效率大大提高。

文献报道在慢病毒内部启动子前引入 PPT 元件可以提高目的基因的表达效率，将此序列插入慢病毒载体可以促进对 CD34⁺造血干细胞的转导。Park(2001)等还发现整合了 cPPT 的载体能在体外增加转导效率，在体内能增加对非细胞周期肝脏细胞的转导效率。李振宇(2004)等在转移质粒的构建中引入了 PPT 元件，结果证实 PPT 元件确实能够提高慢病毒载体的转导效率，可能与其促进 HIV-1 基因组转入被感染的细胞核内有关。

现在许多学者已将慢病毒载体感染后的造血干细胞应用于临床基础研究，并取得了较好的预期效果。如应用表达β-珠蛋白的慢病毒载体转染 HSC 后，有效地纠正了重症地中海贫血模型鼠的贫血症状。研究还发现，当慢病毒载体整合至人的 HSC 后，可携带外源的目的基因在 HSC 内长期的表达。

13.3.1.3 腺相关病毒载体

重组 AAV 转导造血细胞系的效率低于其他细胞系，转导 HSC 的效率更低，转移基因多呈瞬时表达。原因之一可能是 HSC 分化程度低，所表达的受体和可能的辅助受体的数量少；其二是 AAV 含单链基因组，基因表达或整合之前需要形成双链 DNA，因而第二条链的合成是转导的限速步骤，在此过程中形成的连环分子随细胞分裂或降解使基因呈现瞬时表达，而整合到基因组的频率决定了转导效率的高低，整合频率高，则 HSC 的转导效率高。

13.3.2 其他干细胞的转染

13.3.2.1 神经干细胞的基因治疗

体外获得神经干细胞(neural stem all, NSC)的途径有 3 种：①用逆转录病毒作为载体，将原癌基因如 *v-myc* 和 SV40 大 T 抗原等导入神经细胞，使其成为永生化细胞；②在特殊的无血清培养基中加入表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及其他因子，使来自胚胎或成人的其他干细胞或神经干细胞在体外增殖；③通过诱导作用，使胚胎干细胞成为神经干细胞。当受到外界环境因素刺激或去除生长因子时干细胞即开始分化为各种成熟的神经细胞和胶质细胞。其中最有前途的是通过诱导胚胎干细胞使其成

为神经干细胞。

神经干细胞可作为中枢神经系统基因治疗的载体细胞，通过转基因技术，将外源性治疗基因导入神经干细胞中，使其在体内有效表达，改善局部微环境以维持细胞的生存和增殖。另外，为了达到某种特殊治疗目的，可对移植的干细胞进行基因修饰，使其在局部产生特殊的蛋白质。由于神经干细胞具有基因的可操作性，可携带多个外源基因，转染后外源基因在体内、体外稳定表达，移植后可整合宿主脑组织中，并在宿主脑内迁移等优点，使其成为基因治疗的良好载体。神经干细胞作为基因或药物治疗载体具有以下优点：①有迁移能力，能远距离弥散迁移到病变部位。②能整合于宿主组织，外源基因表达稳定。③有潜在分化能力和修复功能，在脑及脊髓中能根据其周围微环境的诱导而分裂分化成相应的细胞类型，其形态和功能与附近的宿主细胞非常近似，因而能部分补偿损伤和死亡细胞的功能。④自身干细胞移植，结构上能整合于宿主体内。另外，中枢神经系统具备特殊的结构-血脑屏障，使得淋巴细胞在正常情况下很难进入，因此不同个体之间甚至不同物种之间的 NSC 移植物几乎无排异反应，大大拓宽了 NSC 的来源。⑤NSC 可以在体外根据不同的需要导入相应的外源基因而成为一种广谱的细胞载体。动物实验表明，经过基因修饰而携带有外源基因的神经干细胞移植到脑内后迁移并整合于病变部位，长时间表达外源基因产物。近年来许多学者把原代 NSC 用于神经细胞移植。Age 等(1995)将 FGF-2 扩增的成鼠 NSC 移植到成年鼠的海马回，存活的细胞在移植后 3 个月仍清晰可见，并分化为与宿主神经元细胞相似的神经细胞。由于中枢神经系统损伤后，自我修复效果不良的原因不仅是 NSC 的数量不足，更重要的是损伤局部微环境抑制神经元细胞的再生，故在 NSC 移植中，单纯补充数量是不够的。为了维持细胞的生存及增殖，基因治疗最有前景。

采用何种载体体外转染神经干细胞，从而获得外源基因的高效转染和表达非常重要。Anna Falk(2002)对比了质粒直接转染和腺病毒(pQBI-AdCMV5)、逆转录病毒[水疱性口膜炎病毒 G 蛋白(VSV-G)假型逆转录载体]、慢病毒(载体质粒 pHR-CMV-GFP-W、包装质粒 pCMV-R8.91 和包膜质粒 pMD.G)对神经干细胞的转染效率。在 Invitrogen 四种阳离子脂质体 Lipofectamine、Cellfectin、Lipofectin 和 DMRIE-C 介导的质粒转染中，Cellfectin 方法最有效，约有 11%的细胞表达绿色荧光蛋白；而腺病毒、逆转录病毒和慢病毒对神经干细胞的转染效率分别为 68%、60%和 10%。腺病毒对神经干细胞高的转染效率同神经干细胞高表达 CVADR 受体有关。

13.3.2.2 骨髓间充质干细胞

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell，BMSC)也称骨髓基质来源干细胞(bone marrow stroma derived stem cell，BMSC)。BMSC 作为基因治疗的载体与其他组织干细胞相比具有许多优点。首先它取自骨髓，来源充足，取材容易，不像胚胎干细胞(ESC)的来源受到伦理道德的约束。BMSC 的分离培养操作简单、只需吸取少量骨髓，相比之下要获得足够量的造血干细胞(HSC)则需要大量的骨髓，而且体外培养中难于扩增。另外 BMSC 的移植排斥反应弱，且因其取自骨髓，则可通过自体骨髓移植避免移植排斥反应。研究还表明：逆转录病毒介导的多种外源目的基因可整合至 BMSC 基因组 DNA 中并能长期表达。因此是 BMSC 被作为一种理想的靶细胞用于体外基因治疗。

BMSC 为转基因研究带来希望的同时，也提出了应注意的问题。首先，要掌握适宜的体外转染时间。Banfi 报道体外培养扩增会使人的 BMSC 逐渐失去前体细胞的特点，所以培养时间和条件对于 BMSC 的应用是非常重要的。其次，是使目的基因高效持久表达。目前寻找调节 BMSC 扩增及分化的分子信号途径为新的研究热点，这将有助于了解 BMSC 的分化机制，从而拓宽 BMSC 的应用领域。

BMSC 在体外培养中，至少有三种状态，即梭形细胞、小的圆形细胞和大的扁平细胞。梭形细胞和小的圆形细胞增殖能力较强，大的扁平细胞增殖能力则较弱。随着培养时间的延长，到第 4 代时，培养体系中细胞形态趋于同一化，多呈梭形；细胞增殖能力也随着大的扁平细胞在培养体系中增多而相应减弱。因此在进行逆转录病毒转染时，第 3 代至第 6 代的 BMSC 可能由于其细胞分裂旺盛而转染效率较高。

13.3.2.3　胚胎干细胞

Michal(2003)采用慢病毒载体转染胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)，通过以下方式的优化使转染效率达到 30%~38%。①转染时采用无血清介质；②采用两次连续转染，在没有滋养层的条件下，病毒与没有分化的悬浮的 hES 细胞团(150~200 个细胞)孵育 1.5h，随后加入新鲜的病毒再孵育 1.5h，之后，在含有滋养层的条件下常规培养；③对 HIV-1 慢病毒载体进行改造。将 WPRE 或 cPPT 序列插入 HIV-1 SIN18 载体，从而使转基因的表达提高了 2 倍，转染效率提高了 3 倍。另外，用 hPGK 启动子代替 hEF1α(eukaryotic translation elongation factor-1α)，它对分化和未分化的 ES 细胞都有活性。此修饰的载体(图 13.7)比未修饰的载体转染效率高 5~6 倍，基因表达量提高 2 倍。具体操作：采用脂质体(FuGENE6 transfection reagent)法三质粒[10μg 的转移载体，6.5μg 的包装质粒载体(pCMVΔR8.91)，3.5μg 的 VSVg 包膜质粒载体(pMD.G)]瞬时共转染 293T 细胞，转染 48~72h 后收集病毒上清，0.45μm 滤膜过滤，4℃、50 000*g* 离心 1.5h 收集病毒浓缩液。然后转染 ES 细胞。即用胰酶消化 hES 细胞团，使之分离成含大约含 200 个细胞的未分化 ES 细胞团，将此细胞团转入含有病毒颗粒和 0.5μg/μl 的凝聚胺培养介质中，37℃孵育 1.5h，随后重新加入病毒再孵育 1.5h。转染后的 hES 细胞团用 PBS 洗涤后，铺于新鲜的大鼠滋养层上培养，7 天后用流式检测转染效率。

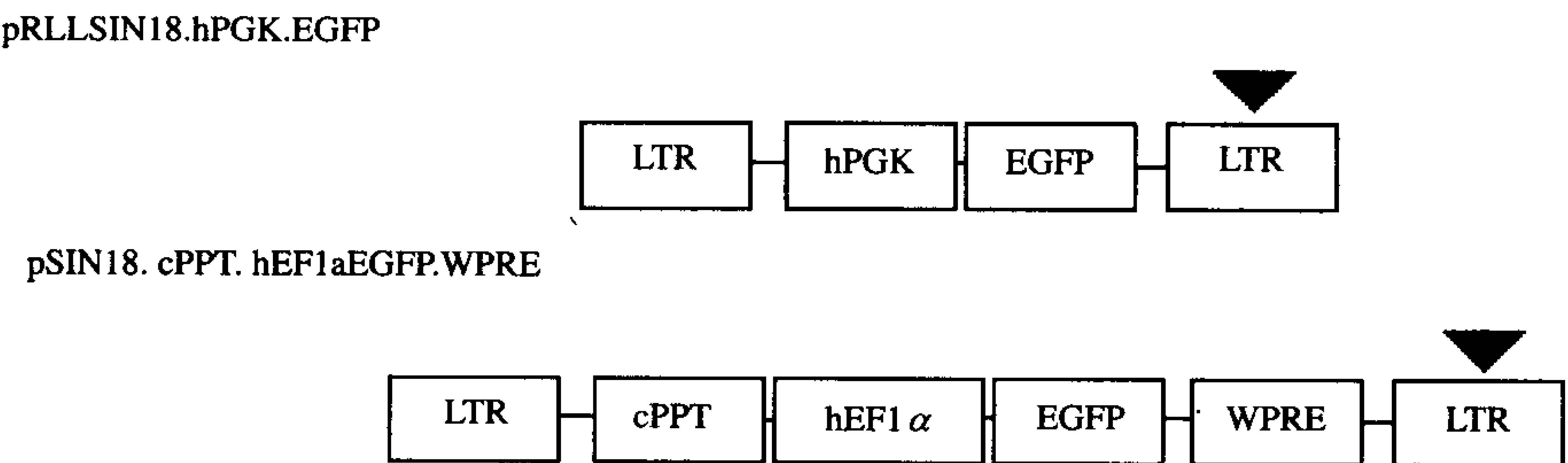


图 13.7　修饰的载体图

13.4 以干细胞为基因导入靶细胞的基因治疗临床应用策略及前景

干细胞具有不断的自我更新、增殖分化的能力。将治疗基因导入干细胞可以减少甚或免除基因治疗的重复使用。在美国初步统计的基因治疗临床方案中，近 1/3 涉及干细胞。造血干细胞(hematopoietic stem cell，HSC)因具有高度的自我更新能力，能分化产生各系血细胞，直接与血液相接触或存在于血液循环之中，极利于转染细胞的表达产物释放入血液，而且 HSC 从鉴定，分离纯化到体外培养、扩增以及自体或异体移植等已具备一套成熟的技术路线，并已为临床所普遍使用。加之成熟的骨髓移植技术结合有效的病毒载体和基因转导策略，将基因转导至 HSC，使转导基因终生存在于血细胞内，为 HSC 的基因治疗奠定了良好的细胞学基础。因此 HSC 是最早、也是公认为最理想的基因治疗的靶细胞之一。

13.4.1 以造血干细胞为基因导入靶细胞的基因治疗临床应用策略

13.4.1.1 单基因疾病

13.4.1.1.1 重症联合免疫缺陷

重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency disease，SCID)是由于腺苷脱氨酶(adenosine deaminase，ADA)缺乏引起的。近来，通过携带 ADA 的逆转录病毒转染外周血 T 细胞/HSC，回输患者体内重建机体的免疫功能，在 ADA-SCID 的临床基因治疗实验中取得了重要进展。Kohn 等将 ADA 基因导入 3 例诊断为 SCID 患儿自身脐带血 $CD34^+$细胞，回输患者体内。6 年后，外周血淋巴细胞中仍可检测到转移的 ADA 基因，在此过程中需要补充腺苷脱氨酶进行替代治疗；但有证据表明，在外源性 ADA 应用减少时，携带 ADA 基因的 T 细胞数量增加，使人们坚信这 3 例儿童最终将摆脱外源性 ADA 的治疗；Aiuti 等(2002)在未进行骨髓清洗的条件下，采用逆转录病毒转导 HSC 条件，对两例 ADA-SCID 患儿进行临床基因治疗实验，研究结果发现，移植的经逆转录病毒转导的自体骨髓 HSC 能够进行多谱系分化，淋巴细胞数量增多，免疫功能增强，临床评价状况良好，能够正常生长和发育。ADA-SCID 基因治疗的成功，为 HSC 受累的其他疾病的基因治疗提供了经验。

13.4.1.1.2 地中海贫血

地中海贫血是α与β两类珠蛋白基因表达失衡而引起的遗传性溶血性疾病，其中β地中海贫血危害最严重。β地中海贫血是一种常见的单基因遗传病，而且β-珠蛋白基因定位结构明确，对相应的调控基因了解较清楚，因此β地中海贫血也是最早被用于基因治疗的疾病之一。理论上讲，将正常的β-珠蛋白基因转入患者的造血干细胞以替代或修复缺陷的基因发挥功能，是可以治疗β地中海贫血。1995 年通过构建携有β-珠蛋白基因的相关调控区 DNA 片段的腺相关病毒转染小鼠红白血病细胞，人β-珠蛋白基因低表达得到了纠正，且使β地中海贫血小鼠的症状得到改善。曾有研究在小鼠动物模型上将β基因通过逆转录病毒载体转染鼠造血干细胞，在受体红细胞中获得表达。以上结果表明，地中海贫血的基因治疗是可行的。但是由于β地中海贫血的异质性较高，具有发育阶段

特异性和表达调控的复杂性，目前已发现 170 个以上的突变类型，很难有针对性的基因替代，使其真正应用于临床尚需进一步深入研究。

13.4.1.2 造血干细胞在肿瘤治疗中的应用

化疗是肿瘤治疗的主要措施之一，但是在治疗过程中药效往往因肿瘤细胞产生耐药而降低，而且化疗药物所产生的副作用也使患者难以承受。因此在采取化疗的同时，既能减少化疗药物的毒副作用，减少骨髓受抑制的程度，保护免疫系统的功能不受破坏，又可加大化疗剂量，提高化疗效果是众多学者多年来致力研究的问题。近年研究表明，一些基因可以减弱肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性。例如，二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase，DHFR)基因的突变可以使氨甲蝶呤的药效降低；而多药耐药(multidrug resistance，MDR)基因的过表达与诸多肿瘤，如肉瘤、神经母细胞瘤的化疗失败有关。而将耐药基因导入骨髓细胞使之获得耐药表型，可增加骨髓对化疗药物的耐受性，为临床超剂量化疗和多次重复进行化疗提供了可行性。

Richardson 等先给小鼠使用 5-FU 后收集小鼠的骨髓细胞，再经 IL-3、IL-6、SCF 因子预刺激，用 MDR 病毒上清转染骨髓细胞并回输经射线照射的受体鼠，PCR 分析受体鼠外周血 DNA，结果表明骨髓移植后 4 个月仍有高水平的 MDR 表达。Hanania 等用携带 MDR 的逆转录病毒载体转染人骨髓 $CD34^+$细胞，与未转染的 $CD34^+$细胞相比，前者对 Taxol 的抗药性高于后者，将人基因转染小鼠造血细胞并移植后重建，结果人基因在小鼠造血细胞的表达持续 17 个月，对 Taxol 的耐药性提高了 4 倍。国内毛宁(周生 2003)等通过构建含人 MDR-1 基因的新型逆转录病毒载体 SF-MDR，探讨了该载体介导的基因转染对骨髓细胞体内造血重建功能的影响。结果表明基因转染效率得到有效提高，流式细胞仪检测 P 蛋白表达阳性细胞由转染前的 0.04%提高到 16.1%，差异非常显著;体外粒-巨噬系祖细胞耐药集落测定结果显示，转基因骨髓细胞对 Taxol 和 Colchicine 的耐受能力较对照组明显提高；骨髓移植后 8 个月经 Taxol 体内筛选，全部小鼠可于外周血细胞基因组 DNA 中检测到外源基因 MDR-1。

13.4.1.3 造血干细胞在心血管疾病中的应用

心脑血管病是危害人类生命健康的最严重疾病之一，其发病率和病死率均占各类疾病之首。虽然近百年来对心血管病防治的研究已取得巨大成就，但尚未找到十分理想的防治方法。随着心血管发病机制和基因转移技术的发展，心脑血管病的干细胞基因治疗也取得了可喜的成绩。因为干细胞有向损伤部位迁移并修复受损伤的组织的特性。Tse 等(2003)对 8 名患有严重缺血性心脏病的患者在心肌电图引导下经皮导管内心肌自体注入 HSC，经 3 个月随访，患者临床症状减轻，MRI 显示心肌灌注和心肌功能均有改善。另一项研究将自体骨髓来源的干细胞注入 6 名心肌梗死并已行冠脉搭桥术患者心肌梗死边缘区域，术后 3~9 月，所有患者心肌灌注改善，其中 5 人改善明显。Strauer 等(2002)首次报道在急性心肌梗死患者中经冠脉移植自体骨髓细胞的临床试验。20 例接受经皮冠状动脉介入治疗的急性透壁心肌梗死患者，10 例在心肌梗死后 5~9 天经梗死相关动脉移植自体骨髓单个核细胞，3 个月后与未接受细胞移植的对照组比较，细胞移植组心功能显著改善，梗死面积缩小。作者认为显著的治疗作用可能与骨髓细胞的心肌再生和促进

新生血管形成有关。随后有报道对急性心肌梗死行急诊支架植入再灌注治疗的 20 例患者，经梗死相关动脉移植自体骨髓单个核细胞或外周血祖细胞，随访 4 个月未见恶性心律失常，细胞移植治疗显著提高左室收缩功能，改善梗死区域的室壁运动和梗死相关动脉的血流储备，缩小收缩期末左室容积。Jackson 等使用高度富集 HSC 的骨髓细胞移植入接受致死剂量射线照射的小鼠，重建造血系统后，结扎小鼠的左前降支造成心肌梗死模型，在梗死心肌的周边区域发现供体来源的心肌细胞及血管内皮细胞。目前对于 HSC 是否真正具有转分化能力尚有不同的意见，需要进一步研究。但随着干细胞移植治疗的深入研究，干细胞移植结合梗死心肌的血运重建和药物治疗，可能成为将来防治心肌梗死更有前途的方法。

13.4.1.4 造血干细胞基因治疗在 HIV 感染中的应用

艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome，AIDS)是人体淋巴系统被人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus，HIV)破坏所致的一种获得性免疫缺陷病。HIV 感染的基因治疗，是通过理化或生物学方法，把目的基因导入自体外周血或骨髓来源的干细胞，抑制病毒的复制，并缓解 HIV 感染引起的恶性肿瘤症状。以 HSC 为载体转导抗 HIV 基因可以重建各系血细胞使其免于 HIV 感染，而逐渐恢复机体的免疫功能。有研究报道将核酶基因转入 $CD34^+$细胞，发现转染后的细胞及子代细胞均不被 HIV 感染。有研究通过粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员 AIDS 患者外周血 $CD34^+$细胞并转染核酶基因，发现转染后的 $CD34^+$细胞增殖，分化能力与健康人来源的 $CD34^+$无差异，但是其子代细胞表达抗 HIV 基因，并可持续稳定抑制 HIV 复制。Kohn 等(1999)将 4 例 HIV 感染的患者自体骨髓 HSC 通过逆转录病毒转导抗 HIV 基因 RRE(rev-responsive element decoy gene)后回输患者体内，获得了一定的抗病效果。1 年后在患者的外周血中仍可检测到携带 RRE 基因的血细胞存在，但其表达水平较低。研究结果提示利用造血干细胞特性，将抗 HIV 基因导入造血干细胞治疗 AIDS 的方法是可行的，但需要提高基因转染效率以期获得良好的治疗效果。总之，以造血干细胞为靶细胞，导入抗 HIV 基因使机体获得持久的免疫重建，将是治疗 AIDS 的一个理想策略。

13.4.1.5 基因标记评价骨髓移植复发原因和造血重建

基因标记是将细胞中不存在的某种中性基因，如 *NeoR* 或 *LacZ* 等转染到靶细胞内并使之整和到细胞基因组中，这样标记基因即可随着宿主细胞基因组的复制而复制并传给子代细胞。通过对标记基因的检测可以追踪观察被标记基因的行为，因此可解决骨髓移植后复发原因和骨髓净化效果，并评价骨髓的造血重建功能。

13.4.1.5.1 确定自体造血干细胞移植后的恶性肿瘤复发的细胞来源和净化效果

利用基因标记技术可以确定恶性肿瘤复发的细胞来源和净化效果，从而指导临床治疗。由于标记基因在被标记细胞的所有子代细胞中都以相同的形式存在，即使移植物中只有少量的恶性细胞被标记，在复发时随着恶性细胞群的大量扩增，这种基因标记信号就会得到放大，从而易于检测；加之被转染的细胞死亡后，标志基因也随之丢失，故在自体造血干细胞移植后，任何带有标志基因肿瘤细胞的发现都是移植物中有恶性细胞存在并复发的一个证据。因而基因标记比放射性核素或荧光素标记具有更高的敏感性和特

异性。

近年来，基因标记技术已经用于多种恶性肿瘤患者自体 HSC 移植后复发来源的研究。此类实验一般是将带有 *NeoR* 的逆转录病毒载体转染后的自体外周血或骨髓造血干细胞回输患者体内，复发后通过 PCR 或用新霉素类似物 G418 培养而确定复发的肿瘤细胞中是否含有 *NeoR*。在儿童急性髓系白血病(AML)的研究中，复发的 4 例患者中有 2 例可以肯定在复发的白血病细胞中带有 *NeoR* 基因；Rill 等对神经母细胞瘤的研究结果显示，5 例复发患者中 4 例可检测到 *NeoR* 阳性的肿瘤细胞；而 Deisseroth 等研究慢性髓系白血病(CML) 的结果则表明，2 例复发患者的白血病细胞中均发现 *NeoR* 基因。这些资料清楚地说明了这 3 种恶性肿瘤在完全缓解期或慢性期采集的骨髓中含有能在体内导致肿瘤复发的恶性细胞，这些恶性细胞可以在髓内或髓外引起肿瘤的复发。因此，对移植物进行有效的体外净化是改善此类患者移植效果的关键。

体外净化技术虽然可有效地清除大部分肿瘤细胞，但仍缺乏直接证据显示体外净化可以明显降低复发率。而 Gorin 等在对 AML 患者自体骨髓移植后效果调查中发现 26.7%接受未净化骨髓的患者在 15 天时白细胞计数超过 1×10^9 个/L，而接受净化后骨髓的患者只有 3.6%达到这种程度($P = 0.015$)；这说明当前的体外净化技术对正常造血祖细胞也有损伤作用，从而影响了移植物的植入及造血的恢复，由此导致的并发症和死亡率也相应地增加。因此，对于是否有必要进行体外净化成为学者们争论的焦点。根据前面的几个基因标记实验的结果可以认为对移植物进行有效的体外净化是必须的，而关键是寻找更具选择性的净化方法，以尽可能多地清除肿瘤细胞，保留正常造血细胞的数量和功能以重建患者的造血。

13.4.1.5.2 研究造血重建功能

造血干细胞移植后能否重建造血功能对指导和确定临床治疗方案具有重要意义。如果移植物由于体外的一系列处理使 HSC 数量减少，不足以恢复长期造血，只能通过造血祖细胞及成熟血细胞起到暂时性造血恢复作用，而长期造血的重建仍由大剂量放化疗后体内残存的 HSC 负责，则联合应用造血生长因子刺激造血应当与造血干细胞的输注同样有效，且还可以避免因自体移植物的回输而将肿瘤细胞重新带入体内；但若移植物在长期造血重建中发挥重要作用，则对患者进行造血干细胞移植就将在治疗中起关键作用。

Brenner 等追踪 20 例患者骨髓细胞转染 *NeoR* 基因回输后造血重建的结果，发现在自体骨髓移植后 1 个月，存活的 18 例患者中 15 例体内各系造血细胞中均有 *NeoR* 基因的存在和表达，追踪观察部分患者 *NeoR* 基因持续存在达 4 年之久。这说明移植骨髓中有多能造血干细胞存在并能够在体内重建长期造血。Dunbar 等利用双基因标记技术对 11 例骨髓瘤和乳癌患者的外周血和骨髓 $CD34^+$细胞分别进行标记后共同回输，从而比较两种来源的干细胞在造血重建中的作用，结果除 1 例因化疗死亡外，其余 10 例移植物植入后在其粒系、淋巴系等多系细胞中均可检测到标志基因，3 例患者细胞内标志基因持续存在超过 18 个月，而且部分患者的标志基因既有外周血来源的又有骨髓来源的。说明外周血造血干细胞与骨髓造血干细胞一样也可重建长期造血。

总之，对于 HSC 基因治疗来说，在深入了解 HSC 生物学特性、转导 HSC 的体外扩增以及疾病分子缺陷的基础上，需要明确以下几个问题：①经过基因修饰的 HSC 在体内

是否具有生长优势，如果有，需要多少经基因修饰的 HSC 能够维持长期功能；②对于某些免疫缺陷疾病，基因转移后免疫系统是否能够保护个体；③未受调控表达的基因产物对细胞是否产生毒性；④在临床前和临床基因治疗研究中优化、发展适合 HSC 基因转移的载体系统，探索其基因转移效率、表达水平和安全性。在上述研究的基础上，相信 HSC 的人类基因治疗将会获得成功。

13.4.2　干细胞基因治疗应用前景

虽然目前基因治疗的临床方案中所应用的靶细胞多为 HSC，但是其他成体干细胞，如神经干细胞、成肌细胞、成骨细胞和骨髓间充质干细胞在基因治疗中的研究日益增多。特别是骨髓间充质干细胞，由于其来源广泛，易于体外培养扩增及外源基因的转染和表达，具有向其他胚层分化的潜能性，移植排斥反应较弱，并易于外源基因的转染和表达，而且经基因修饰的 MSC 以及子代细胞有向病灶趋化的特性，是具有细胞治疗和基因治疗潜在使用价值的有效载体，对临床治疗多种遗传性疾病或获得性疾病展现美好的应用前景。

（赵敬湘　杨丽平）

主要参考文献

李振宇，徐开林，潘秀英等. 2004. HIV-1 慢病毒载体的构建及结构改造. 中华血液学杂志，25: 571~572

裴雪涛. 1998. 新一代细胞疗法：造血祖细胞体外扩增与定向诱导分化. 中国实验血液学杂志，6: 1~5

裴雪涛. 2003. 干细胞生物学. 北京：科学出版社

伍志坚，黄海金，梁国栋. 1998. 用于基因治疗的慢病毒载体. 中华实验和临床病毒学杂志，12(2): 195~198

周生，毛宁，赵明等. 1998. 重组人 FLT3(FL)对人脐血 CD34+细胞的体外扩增. 中华医学杂志, 78: 37~39

Age GH, Goates PW, Palme TD. 1995. Survival and differentiation if adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. J Proc Natl Acad Sci USA，92:11879~11883

Aiuti A，Slavin S，Aker M et al. 2002. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. Science. 296 (5577):2410~2413

Anna F，Niklas H，Marie C. 2002. Gene delivery to adult neural stem cells.Exp Cell Res，279: 34~39

Donald BK，Gerhard B，Robert R. 1999. A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a rev-responsive element decoy gene into CD341 cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1–infected children. Blood, 94: 368~371

Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al.2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J Clin Invest，107: 1395~1402

Michal G，Pavel I，Orna S et al. 2003. Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. Mol Ther, (7): 281~287

Park F，Kay MA. 2001. Modified HIV21 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression *in vitro* and *in vivo*. Mol Ther，4 : 164~173

Salmon P，Kindler V，Ducrey O et al. 2000. High level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. Blood，96(10): 3392~3398

Scherr M，Eder M. 2002. Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. Curr Gene Ther，2(1): 45~55

Strauer BE，Brehm M，Zeus T et al. 2002. Repair of infracted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. Circulation, 106: 1913~1918

Tang-chuang HE，Shibin Zhou，Luis T C et al. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad

Sci USA, 95: 2509~2514

Tse HF, Kwong YL, Chan JK et al. 2003. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. Lancet, 361(9351): 47~49

Zufferey R, Donello JE, Trono D et al. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. J Virol, 73 (4): 2886~2892

附录1 缩 略 语

英文缩写	英文全称	中文译文
5-aza	5-azacytidine	5-氮胞苷
AA	allyl alcohol	丙稀醇
AAV	adeno-associated virus vector	腺相关病毒载体
Ac-LDL	acetylated low-density lipoprotein	乙酰化低密度脂蛋白
ADA	adenosine deaminase	腺苷脱氨酶
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	获得性免疫缺陷综合征
ASC	adult stem cell	成体干细胞
ATCC	American type culture collection	美国培养细胞库
AV	adenovirus vector	腺病毒载体
BDHSC	bone marrow derived hepatic stem cell	骨髓来源的肝脏干细胞
BDTC	bone marrow derived Thy-$1^{+}\beta_2M^{-}$ cell	骨髓来源的 Thy-$1^{+}\beta_2M^{-}$ 细胞
BFU-E	burst-forming unit-erythrocyte	红系爆式集落形成单位
BLI	*in vivo* bioluminescence imaging	活体生物发光成像
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CFU	colony-forming unit	细胞集落形成单位
CFU-F	fibroblast colony-forming unit	成纤维集落形成单位
CFU-GM	colony forming unit-granulocyte/macrophage	粒-巨噬细胞集落形成单位
CFU-mix/CFU-GEMM	clony forming unit-mix，clony forming unit-granulocyte/erythrocyte/macrophage/megakary ocyte	多系或混合集落形成单位
COC	cumulus oocyte complex	卵丘卵母细胞复合物
CPE	cytopathic effect	细胞溶解现象
CT	computed tomography	计算机断层摄影
DAT	dopamine transportor	多巴胺递质转运子
DC	dendritic cell	树突细胞
DEPC	diethylpyrocarbonate	二乙基焦磷酸
DHFR	dihydrofolate reductase gene	二氢叶酸还原酶基因
DIC	differential interference constrast	差分干涉反差

续表

英文缩写	英文全称	中文译文
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium	Dulbecco 必需基本培养基
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DsRed	discosoma red fluorescent protein	红色荧光蛋白
EC	embryonal carcinoma	胚胎瘤
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附反应
EPC	endothelial progenitor cell	血管内皮祖细胞
ES	embryonic stem cell	胚胎干细胞
FACS	fluorescence-activated cell sorting	荧光活化细胞分选
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FITC	fluorescein isothiocynate	异硫氢酸荧光素
FL	Flt3 ligand	造血生长因子 Flt3 配体
FOV	field of view	视野
Gal C	galactocerebroside C	半乳糖脑苷脂
GFAP	glialfibrillary acidic protein	胶质纤维酸性蛋白
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GST	glutathione S-transferase	谷胱甘肽巯基转移酶
GVHD	graft versus host disease	移植物抗宿主病
HCG	human chorionic gonadotrophin	人绒毛膜促性腺激素
HEPES	hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid	羟乙基哌嗪乙磺酸
HGF	hepatocyte growth factor	肝脏细胞生长因子
HIV	human immunodeficiency virus	免疫缺陷病毒
HPP-CFU	high proliferative potential-colony forming unit	高增殖潜能集落形成单位
HSC	hematopoietic stem cell	造血干细胞
HSV	herpes simplex virus vector	纯疱疹病载体
hygr	hygromycin	潮霉素耐药基因
ICM	inner cell mass	内细胞团
IL-3	interleukin-3	白细胞介素-3
IL-6	interleukin-6	白细胞介素-6
IPTG	isopropyl-*β*-*D*-thiogalactoside	异丙基 *β*-*D*-半乳糖苷

英文缩写	英文全称	中文译文
IVF	*in vitro* fertilization	试管受精
KGF	keratinocyte grow factor	角质细胞生长因子
LH	luteinizing hormone	黄体生成素
LIF	leukemia inhibitory factor	白血病抑制因子
Lin- cell	lineage commitment markers negative cell	Lin-细胞
LTC-IC	long term culture initiating cell	长期培养起始细胞
LV	lentivirus vector	慢病毒载体
MACS	magnetic activated cell sorting	磁性激活的细胞分选
MAPC	multipotent adult progenitor cell	多能成体祖细胞
MAPK	mitogen-activated protein kinase	有丝分裂原活化蛋白激酶
MDR	multidrug resistance	多药耐药基因
MI	mithramycin	光辉霉素
MNC	mononuclear cell	单个核细胞
MOI	multiplicity of infection	感染强度
MPF	maturation promotion factor	卵成熟促进因子
MRI	magnetic resonance imaging	核磁共振成像
MSC	mesenchymal stem cell	间充质干细胞
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐
NaN_3	sodium azide	叠氮化钠
NBCS	new born calf serum	新生牛血清
neo	neomycin	新霉素耐药基因
NOD	non obese diabetic	非肥胖糖尿病
NPC	neural progenitor cell	神经祖细胞
NSC	neural stem cell	神经干细胞
NT	nuclear transplantation	核移植
OSM	oncostatin M	抑瘤素
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲溶液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应

续表

英文缩写	英文全称	中文译文
PDX-1	pancreas duodenal homeobox 1	胰岛素启动因子 1
PE	phycoerythrin	藻红素
PET	positron-emission tomography	正电子衍射成像
PFU	plaque forming unit	空斑形成单位
PGA	polyglycolic	聚乙醇酸
PI	propidium iodide	碘化丙锭
PLA	poly lactic acid	聚乳酸
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride	苯甲磺酰氟
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin	孕马血清促性腺激素
PY	pyronin Y	派洛宁
puro	puromycin	嘌呤霉素耐药基因
RCA	replication center assay	复制中心检测
RCT	randomization controlled trial	随机对照研究
RV	retrovirus vector	逆转录病毒载体
SCF	stem cell factor	干细胞因子
SCID	severe combined immune deficiency	重症联合免疫缺陷
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SP	side population cell	侧群细胞
SPECT	single-photon-emission computed tomography	单光子衍射成像
SRC	SCID repopulating cell	SCID 小鼠再植细胞
STZ	streptozotocin	链脲佐菌素
TA	transient amphlifying cell	短暂增殖细胞
TH	tyrosine hydroxylase	酪氨酸羟化酶
TK	thymidine kinase	胸苷激酶
TnI	troponin I	肌钙蛋白 I
TPA	12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate	十四烷酰佛波乙酸酯
UEA-1	Ulex europaeus agglutinin-1	荆豆凝集素 1
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮细胞生长因子
X-gal	5-bromo-4-chloro-3- indolyl-β-*D*-galactopyranoside	5-溴-4-氯-3-吲哚-β-*D*-半乳糖苷

附录 2　常用溶液配制方法

● 无钙镁离子 PBS

NaCl 0.8g、KCl 0.2g、$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g、KH_2PO_4 0.2g，加去离子水定容为1000ml。高压灭菌后，4℃冰箱保存。

● D-Hank 缓冲液

NaCl 8g、KCl 0.4g、$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0.06g、KH_2PO_4 0.06g、$NaHCO_3$ 0.35g，加去离子水定容为 1000ml。高压灭菌后，4℃冰箱保存。

● 1mol/L HEPES 液

称取 HEPES 粉剂 23.83g，用去离子水溶解,最后定容至 100ml，用 0.22μm 滤膜过滤，4℃保存。

● 0.6mol/L $NaHCO_3$ 溶液

$NaHCO_3$ 5.6g，加去离子水溶解，定容至 100ml，高压灭菌后，4℃冰箱保存。

● Hank 缓冲液

NaCl 8g、KCl 0.4g、$CaCl_2$ 0.14g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0.06g、KH_2PO_4 0.06g、$NaHCO_3$ 0.35g，加去离子水定容为 1000ml。高压灭菌后，4℃冰箱保存。

● Giemsa 染液

称取 0.5g Giemsa 粉，甘油 33ml，在研钵内先用少量甘油和 Giemsa 粉混合，研磨直至无颗粒为止，再将剩余甘油倒入，56℃保温 2h，加入 33ml 甲醇，保存于棕色瓶内。

● 4%台盼蓝母液

称取 4g 台盼蓝，于研钵中用少量双蒸水研磨，加双蒸水至 100ml，1500r/min 离心15min，吸出上层液，即为 4%储存溶液，室温保存。使用时，用 1.8% NaCl 溶液稀释至0.4%即成工作液。

● 红细胞裂解液

NH_4Cl　　139.6mmol/L

Tris　　16.96 mmol/L

加去离子水至 1L,用 1mol/L HCl 调 pH 至 7.2。

● 肝素抗凝剂

① 肝素注射液 1 支(12 500U)，溶于 25ml 生理盐水，即成 500U/ml 使用液。使用最终浓度为每毫升营养液含 12~20U。

② 称量 0.2g 肝素，溶于 100ml 生理盐水中，8 磅 15min 高压灭菌使用时每毫升营养液内加 0.01~0.02ml。

● 抗生素液

青、链霉素：取青霉素 100 万单位，链霉素 100 万单位，溶于 100ml 灭菌 PBS 中，浓度为青霉素 10 000U/ml 和链霉素 10 000U/ml。使用浓度为 100ml 培养基内加 1ml，则培养基内的最终浓度为 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素。

- **消化液**

(1) 胰蛋白酶溶液：

胰蛋白酶的作用是使细胞间的蛋白质水解从而使细胞离散。不同的组织或细胞对胰蛋白酶的作用反应不一样。胰蛋白酶分散细胞的活性还与其浓度、温度和作用时间有关，在 pH8.0、温度为 37℃时，胰蛋白酶溶液的作用能力最强。在使用胰蛋白酶时，应把握好浓度、温度和作用时间，以免消化过度而造成细胞损伤。因 Ca^{2+}、Mg^{2+}和血清、蛋白质可降低胰蛋白酶的活性，所以配制胰蛋白酶溶液应选用不含 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS。0.25%胰蛋白酶溶液的配制方法如下：

胰蛋白酶粉末(1∶250)	250mg
无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS	加至 100ml

先用少许消毒的 PBS 将胰蛋白酶粉末调至糊状，再补足 PBS 至 100ml。搅拌混匀，置室温 4h 或 4℃冰箱内过夜。0.22μm 滤膜过滤，分装于−20℃保存。

(2) 胶原酶缓冲液：

I 型胶原酶 0.5g，NaCl 8.0g，KCl 0.4g，HEPES 0.38g，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.151g，$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.078g，$NaHCO_3$ 0.35g，$CaCl_2$ 0.56g，葡萄糖 9.0g，酚红 0.006g，加入三蒸水 1000ml，调整 pH 至 7.5，过滤除菌后分装为 200ml，−20℃保存。

(3) EDTA 溶液：

EDTA 是一种化学螯合剂，对细胞有一定的解离作用，且毒性小，价格便宜，使用方便。常与胰蛋白酶溶液按一定比例混合使用，也可单独使用。

0.02% EDTA 溶液配制方法如下：

EDTA·4Na	200mg
无 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS	1000ml

用 $NaHCO_3$ 或 HCl 调 pH 至 7.2。高压消毒灭菌，分装小瓶，4℃保存。

- **丝裂霉素**(50×母液)

取 1mg 包装丝裂霉素，用 1ml Hank 缓冲液溶解，0.22μm 滤膜过滤后分装，置暗处 4℃可存 1 周，长期储存需在−20℃；使用浓度为 2μg/10^6 个细胞或 10μg/ml。

- ***L*-谷氨酰胺储存液**

称取 2.922g *L*-谷氨酰胺，加去离子水至 100ml，即为 200mmol/L。0.22μm 滤膜过除菌分小管−20℃保存。用量为 100ml 培养基加 1ml *L*-谷氨酰胺。

- **Percoll 分离液的制备**

(1) 1.073 密度(人)10ml 量：Percoll 原液 5.13ml、10×PBS 0.57ml、1×PBS 4.3ml 混匀，现用现配。

(2) 1.077 密度(大鼠)10ml 量：Percoll 原液 5.4ml、10×PBS 0.6ml、1×PBS 4ml 混匀，现用现配。

- **0.5%甲基纤维素**(450 黏度单位)

取 0.5g 甲基纤维素溶于 100ml 生理盐水中，高压冷却后置 4℃缓慢溶解。

- **完全培养基**

商品化培养基 1 包(粉剂，一般 1 包可配 1L)，按说明加入一定量的 $NaHCO_3$，去离子水定容至 1L，用 HEPES 调 pH 至 7.4，0.22μm 滤膜过滤除菌；

培养细胞时在培养基中加 10%胎牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 硫酸链霉素即为完全培养基。

- **肝脏细胞灌注储存液**

(1) 10×Leffert 缓冲液：100mmol/L HEPES，30mmol/L KCl，1.3mol/L NaCl，10mmol/L NaH_2PO_4，100mmol/L *D*-葡萄糖，0.22μm 滤膜过滤，4℃保存。

(2) 10×EGTA 溶液(5mmol/L)：1.9g EGTA 加入 100ml 10×Leffert 缓冲液和 800ml 水中，加入 10mol/L NaOH 溶解后调节 pH 至 7.4，定容至 1L，0.22μm 滤膜过滤，4℃保存。

(3) 100×$CaCl_2$ 溶液：2.79g $CaCl_2$ 加入 100ml 去离子水中(2.79 %)，过滤后室温保存。

- **肝脏细胞灌注工作液**

(1) 1×Leffert 缓冲液：调节 pH 至 7.4，过滤后 37℃水浴。

(2) EGTA 溶液：30ml 10×EGTA 加入 270ml Leffert 缓冲液，pH 调至 7.4，过滤后 37℃水浴。

(3) $CaCl_2$ (洗脱缓冲液)：6ml 2.79% $CaCl_2$ 加入 600ml Leffert 缓冲液中，调节 pH 至 7.4，取一半置冰中备用。

(4) 取 100 mg 胶原酶(−20℃保存)加入剩余的 300ml $CaCl_2$ 中，pH 调节至 7.4，过滤后 37℃水浴。

附录3　主要共聚焦激光对应常用荧光染料表

激光	染料	激发波长/nm	发射波长/nm	应用
ArUV 351nm	Indo-1	350	405/480	Ca^{2+}ion
	Hoechst 33342	355	465	A-T range of nuclei acid
	DAPI	360	460	nuclear stain
	BFP to GFP	365	535	FRET
	BFP to YFP	365	535	FRET
	BFP to RFP	365	610	FRET
	Hoechst 33258	365	465	A-T range of nuclei acid
Diode 405nm	DAPI	360	460	nuclear stain
	EBFP	380	440	blue fluorescent protein
	BFP to GFP	390	525	FRET
	Sapphire/Topaz	395	535	FRET
Ar 458nm	CFP to YFP	440	535	FRET
	CFP	455	501	cyanine fluorescent protein
Ar 488 nm	DiOC6	480	501	endoplasmic reticulum
	GFP	480	520	green fluorescent protein
	DiO	484	501	positive ion tracer
	FM 1-43	488	520	synapse, ER
	GFP to RHOD-2	488	595	FRET
	FITC to RHOD-2	488	595	FRET
	FITC to CY3	488	610	FRET
	Alexa-488 to RHOD-2	488	595	FRET
	CY2	489	506	Ab labelling
	FITC	490	520	Ab labelling
	YoYo 1	490	510	DNA
	Acridine Orange	490	530/640	single/double stained nuclei acid

续表

激光	染料	激发波长/nm	发射波长/nm	应用
Ar 488nm	Carboxy SNARF-1	490	580/630	pH indicator
	496nm	Bodipy 493/503	500	506
	Bodipy FL	503	512	
	Calcein/AM	495	520	
	Cl-NERF (pH2.5)	504	540	
	carboxy-fluorescein diacetate	495	520	
	Di-8-ANEPPS	498	713	
	DM-NERF (pH7.0)	497	527	pH ratio
	EGFP	498	516	
	JC-1	498	525	
	Fluo-3	506	526	calcium imaging
	fluorescein diacetate (FDA)	499	520	
	FluorX	494	520	
	Lyso Tracker Green	504	511	
	Oregon Green 500	503	522	
	Merocyanine 540	500	572	
	Rhod 110	497	520	
	Rhodol Green	499	525	
	Calcein	495	520	bone growth
	Alexa Fluor 488	495	519	Ab labelling
	BCECF-AM	500	530	pH indicator
	Merocyanine 540	500	572	membrane potential
	Rhodamine 123	500	540	mitchondria, apoptosis
Ar 515nm	Biodipy FL	503	512	Ab labelling
	Calcium Green	506	526	calcium indicator
	Fluo-3	506	526	calcium indicator
	YFP	513	527	yellow fluorescent protein
	CY3 to CY5	525	610	FRET

续表

激光	染料	激发波长/nm	发射波长/nm	应用
HeNe 543nm	Carboxy SNARF-1	530	580/630	pH indicator
	Propidium iodide	530	615	DNA, RNA
	Alexa Fluor 532	531	554	Ab labelling
	TRITC	541	572	Ab labelling
	Ethidium bromide	545	605	DNA, RNA
	Evans Blue	550	610	retrograde labelling
	DiI	550	565	positive ion tracer
	Cy3	552	565	Ab labelling
	RFP(DsRed)	558	590	red fluorescent protein
	Pararosaniline-Feulgen	560	625	DNA
	Alexa Fluor 568	578	603	Ab labelling
HeNe 633nm	Texas Red	596	620	Ab labelling
	Bodipy 605, 676	605	676	
	CTC 5-cyano-2, 3-ditolyl-tetra-zolium-chloride	602	reduced:630	
	Alexa Fluor 594	590	617	Ab labelling
	Pararosaniline-Feulgen	560	625	DNA
	Cy5	650	667	Ab labelling

附录 4　合适小鼠卵的培养基配方(g/L)

组分	BMOC-3	M16	SECM	BMOC-3+HEPES	M2
NaCl	5.200	5.533	5.540	5.200	5.533
KCl	0.356	0.356	0.356	0.356	0.356
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.252	0.252	—	0.252	0.252
乳酸钙 · $5H_2O$	—	—	0.527	—	—
KH_2PO_4	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.294	0.293	0.294	0.294	0.293
$NaHCO_3$	2.112	2.101	2.112	—	0.349
丙酮酸钠	0.028	0.036	0.028	0.028	0.036
乳酸钠	2.520	2.610	2.416	2.520	2.610
BSA	5.000	4.000	1.000	5.000	4.000
EDTA	0.037	—	—	0.037	—
葡萄糖	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
HEPES	—	—	—	5.950	4.969
青霉素 G 钾*	0.070	0.060	0.060	0.070	0.060
硫酸链霉素*	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
酚红*	0.010	0.010	0.005	—	0.010
蒸馏水至终体积 1L					

注：* 选择使用。

附录 5　Zimmermann 细胞融合培养基成分(pH7.0)

蔗糖	9.584g/100ml
$Mg(C_2H_3O_2)_2 \cdot 4H_2O$	0.011g/100ml
$Ca(C_2H_3O_2)_2$	0.002g/100ml
K_2HPO_4	0.017g/100ml
谷胱甘肽	0.003g/100ml
BSA	1mg

附录 6　补加锶的 M16 培养基

母液	用量	M16(10ml)
母液 A(10×)		
NaCl	5.534g/100ml	1.0ml
KCl	0.356g/100ml	
KH_2PO_4	0.162g/100ml	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.293g/100ml	
乳酸	2.61g/100ml	
葡萄糖	1.0g/100ml	
青霉素和链霉素		
母液 B(10×)		
$NaHCO_3$	2.101g/100ml	1.0ml
酚红	0.01g/100ml	
母液 C(100×)		
丙酮酸钠	0.036g/10ml	0.1ml
母液 D(100×)		
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	2.666g/10ml	0.1ml
H_2O(双蒸)	7.8ml	
BSA	40mg	

附录 7　FDA/NIH 关于基因治疗的相关文献

(1) Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy, dated March 1998,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/somgene.pdf.

(2) Guidance for Industry: Content and Format of Investigational New Drug Applications (INDs) for Phase 1 Studies of Drugs, Including Well-Characterized, Therapeutic, Biotechnology-derived Products, dated November 1995,

http://www.fda.gov/cder/guidance/phase1.pdf.

(3) Draft Guidance for Reviewers: Instructions and Template for Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Reviewers of Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs), dated August 2003,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/cmcsomcell.pdf.

(4) Guidance for Industry and FDA Staff: Class II Special Controls Guidance Document: Human Dura Mater, dated December 18, 2003,

http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/054.html.

(5) Draft Guidance for Industry: Preventive Measures to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps), dated June 2002,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/cjdvcjd0602.htm.

(6) Draft Guidance for Industry: Eligibility Determination for Donors of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps), dated May 2004,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/tissdonor.pdf.

(7) Final Rule: Eligibility Determination for Donors of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products, (69 FR 29786, May 25, 2004),

http://www.fda.gov/cber/rules/suitdonor.pdf.

(8) Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals (1993), July 12, 1993,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptccell.pdf.

(9) ICH Guidance on Quality of Biotechnological/Biological Products: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of biotechnological/Biological Products, (63 FR 50244, September 21, 1998),

http://www.fda.gov/cber/gdlns/qualbiot.pdf.

(10) Guidance for Industry: Source Animal, Product, Preclinical, and Clinical Issues Concerning the Use of Xenotransplantation Products in Humans, dated April 2003,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/clinxeno.pdf.

(11) PHS Guideline on Infectious Disease Issues in Xenotransplantation, January 19, 2001, http://www.fda.gov/cber/xap/docs.htm.

(12) Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use, February 28, 1997,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptc_mab.pdf.

(13) Manual of Standard Operating Procedures and Policies: Intercenter Consultative/Collaborative Review Process, Version 4, dated June 18, 2004,

http://www.fda.gov/oc/ombudsman/intercentersop.pdf.

(14) FDA Guidance Concerning Demonstration of Comparability of Human Biological Products, Including Therapeutic Biotechnology-derived Products, dated April 1996,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/comptest.pdf.

(15) United States Pharmacopoeia (USP) test method entitled, " <71> Sterility Tests, 27th Edition, http://www.usp.org.

(16) ICH Guideline Q5A. Guidance on Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin, (63 FR51074, September 24, 1998),

http://www.fda.gov/cber/gdlns/virsafe.pdf.

(17) Guidance for Industry: Supplemental Guidance on Testing for Replication Competent Retrovirus in Retroviral Vector Based Gene Therapy Products and During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors, dated October 2000,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/retrogt1000.htm.

(18) ICH Topic Q3. Impurities. (Including guidelines on "Impurities in New Drug Substances", "Impurities in New Drug Products", and "Impurities: Residual Solvents"),

http://www.ich.org/UrlGrpServer.jser?@_ID=276&@_TEMPLATE=254.

(19) Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Medical Devices, dated December 1987,

Sections I-IV, http://www.fda.gov/cber/gdlns/lal.pdf.

Section V, http://www.fda.gov/cber/gdlns/lalsection5.pdf.

Appendix B, C and D, http://www.fda.gov/cber/gdlns/lalappendb-d.pdf.

Appendix E, part I, http://www.fda.gov/cber/gdlns/lalappend_e.pdf.

Appendix E, part 2, http://www.fda.gov/cber/gdlns/lalappend_e2.pdf.

(20) Revisions to the General Safety Requirements for Biological Products, 68 FR 10157, March 4, 2003.

(21) ICH Guideline Q5C. Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/ Biological Products, November 1995,

http://www.ich.org/UrlGrpServer.jser?@_ID=276&@_TEMPLATE=254.

(22) ICH Guideline Q1A(R). Stability Testing of New Drugs and Products (Revised guideline), November 2000,

http://www.ich.org/UrlGrpServer.jser?@_ID=276&@_TEMPLATE=254.

(23) Guidance for Industry: Q1E Evaluation of Stability Data, June 2004, http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichstabdta.htm.

(24) Draft Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products, dated June 1998,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/stabdft.pdf.

(25) Guidance for Industry: Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics; Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation, dated May 1999,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/cntanr.pdf.

(26) Guidance for Industry: Environmental Assessment of Human Drug and Biologics Applications, Revision 1, dated July 1998,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/environ.pdf.

(27) Guidance for Industry: Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing, dated June 1987, (Reprinted June 1991),

http://www.fda.gov/cder/guidance/old027fn.pdf.

(28) Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules (NIH Guidelines),

http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines/guidelines.html.

(29) Manual of Standard Operating Procedures and Policies Investigational New Drugs; Issuance of and Response to Clinical Hold Letters for Investigational New Drug Applications, SOPP8201, Version #3, April 27,1999,

http://www.fda.gov/cber/regsopp/8201.htm.

(30) ICH Guideline Q6B. Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, June 1998,

http://www.ich.org/UrlGrpServer.jser?@_ID=276&@_TEMPLATE=254.

(31) Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology, dated April 10, 1985,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptcdna.pdf.

(32) Guidance for Industry: IND Meetings for Human Drugs and Biologics; Chemistry, Manufacturing, and Controls Information, dated May 2001,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/ind052501.htm.

(33) ICH Guideline Q6B: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. March .1999,

http://www.ich.org/pdfICH/Q6bstep4.pdf.

(34) Draft Guidance for Industry: INDs for Phase 2 and 3 Studies of Drugs, Including Specified Therapeutic Biotechnology-Derived Products, Chemistry Manufacturing and Controls Content and Format. February 1999,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/indbiodft.htm.

(35) Class II Special Controls Guidance Document: Human Dura Mater; Draft Guidance for Industry and FDA. October 22, 2002,

http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/054.html.

(36) Draft Guidance for Industry: Preventive Measures to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Human Cells, Tissues, and

Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps). June 2002,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/cjdvcjd0602.htm.

(37) Proposed Rule: Suitability Determination for Donors of Human Cellular and Tissue-Based Products. September 30, 1999. 64 (FR 52696),

http://www.fda.gov/cber/rules/suitdonor.pdf.

(38) ICH Guideline Q5D: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. July 1997,

http://www.ich.org/pdfICH/q5d.pdf.

(39) PHS Guideline on Infectious Disease Issues in Xenotransplantation. January 19, 2001,

http://www.fda.gov/cber/gdlns/xenophs0101.htm.

(40) Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing. June 1987,

http://www.fda.gov/cder/guidance/old027fn.pdf.

(41) Guidance for Industry: Guideline on the Preparation of Investigational New Drug Products (Human and Animal). November 1992,

http://www.fda.gov/cder/guidance/old042fn.pdf.

(42) Draft Guidance for FDA: Review Staff and Sponsors Content and Review of Chemistry, Manufacturing and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). November 2004,

http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm.